

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kristýna Kadlecová

**Role makrofágů při imunosupresi zprostředkované
regulačními T lymfocyty**

**The role of macrophages in immunosuppression
mediated by regulatory T cells**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 3. 5. 2011

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za věnovaný čas, podporu a rady při práci v laboratoři i při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému Oddělení transplantační imunologie za pomoc a rady, zvláště pak Mgr. Janě Procházkové za spolupráci, pomoc a cenné teoretické i praktické rady. Velmi pak děkuji své rodině a blízkým za duševní i hmotnou podporu ve studiu.

Abstrakt

Regulační T buňky (Treg) jsou jedním z nejdůležitějších regulačních mechanismů imunitního systému. Treg tlumí imunitní reakce a brání nadměrné aktivaci imunitního systému. Je popsáno mnoho mechanismů jejich působení. V naší práci jsme se zaměřili na studium role makrofágů v imunosupresi zprostředkované Treg.

Supresorové vlastnosti purifikované populace Treg získané magnetickou separací byly prokázány v proliferačních testech. V závislosti na přítomnosti makrofágů byla pozorována rozdílná suprese proliferace při různých způsobech aktivace efektorových lymfocytů. Treg tlumily v přítomnosti makrofágů proliferaci efektorových lymfocytů více. Toto pozorování vedlo k hypotéze o působení Treg na makrofágy. Metodou průtokové cytometrie však nebylo zjištěno snížení exprese kostimulačních molekul CD80, CD86 nebo CD40 a MHCII molekul na makrofázích kultivovaných v přítomnosti Treg. Ve funkčních testech makrofágy prekultivované s Treg vykazovaly stejnou kostimulační schopnost jako makrofágy prekultivované samotné. Nebylo prokázáno ani cytotoxické působení Treg na makrofágy a to jak metodou průtokové cytometrie, tak metodou live cell imaging.

V jiných modelech, kde docházelo k silnější aktivaci efektorových buněk, Treg proliferaci neinhibovaly i přes přítomnost makrofágů. To vedlo k hypotéze, že by rozdíly v supresi v přítomnosti makrofágů mohly být způsobeny kvantitativně nebo kvalitativně odlišnou aktivací efektorových buněk. Pomocí metod ELISA a q-PCR bylo testováno množství IL-2 v kultuře a jeho produkce efektorovými lymfocyty. Ukázalo se, že produkce IL-2 negativně korelovala s mírou suprese. Navíc přidání exogenního IL-2 supresi eliminovalo. Treg tlumily produkci IL-2 na genové úrovni a relativní exprese genu pro IL-2 korelovala s mírou suprese v původních proliferačních testech. Dříve pozorované rozdíly v supresi jsou tedy pravděpodobně způsobeny rozdílnou kvantitou nebo kvalitou aktivace efektorových lymfocytů a Treg v našich modelech působí tlumením produkce IL-2.

Klíčová slova: regulační T buňky, imunosuprese, makrofágy, produkce IL-2

Abstract

Regulatory T cells (Treg) represent one of the most important mechanisms of immunoregulation. Treg suppress immune reactions and prevent overactivation of the immune system. There are a lot of ways of Treg action described, here we have focused on Treg interference with macrophages.

The suppressor capacity of a highly purified Treg population was demonstrated in proliferation assays. The level of suppression of effector T cell proliferation differs depending on the presence of macrophages in the culture. Treg-mediated suppression was significantly higher in the presence of macrophages. These observations led to hypothesis that Treg affect directly macrophages. However, using flow cytometry, reduction of expression of costimulatory molecules on macrophages after culture with Treg was not observed. Macrophages precultured with Treg showed a comparable functionality as macrophages cultured alone. Neither flow cytometry nor live cell imaging revealed any cytotoxic activity of Treg towards macrophages.

Despite the presence of macrophages, Treg did not suppress effector cell proliferation in a model where stronger activation of effector cells was induced. Therefore, a new hypothesis was proposed – initially observed higher suppression in the presence of macrophages was probably caused by a qualitatively or quantitatively different activation of effector lymphocytes. The amount of activation cytokine IL-2 in the cultures and its production by effector T cells was tested using ELISA and q-PCR. Negative correlation between the amount of IL-2 and the level of Treg suppression was observed. The level of IL-2 in the culture and of IL-2 mRNA were higher in the cultures where Treg did not suppress proliferation. Moreover, the addition of exogenic IL-2 abrogated the suppression. Treg suppressed production of IL-2 on the level of the gene expression and relative gene expression of IL-2 correlated with the level of Treg suppression in original proliferation assays. The differences in the suppression of cell proliferation were probably caused by qualitatively or quantitatively different activation of effector lymphocytes and Treg suppressed production of IL-2 by effector cells.

Keywords: regulatory T cells, immunosuppression, macrophages, IL-2 production

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	10
3. Cíle diplomové práce	11
4. Literární přehled	12
4. 1. Historie Treg	12
4. 2. Fenotypová charakterizace Treg	14
4. 3. Supresorové mechanismy Treg	14
4. 3. 1. Mechanismus suprese Treg in vitro	15
4. 3. 2. Mechanismus suprese Treg in vivo	16
4. 4. Treg a jejich působení na makrofágy	17
4. 4. 1. Treg a ovlivnění produkce cytokinů makrofágy	17
4. 4. 2. Treg a ovlivnění exprese makrofágových kostimulačních molekul	19
4. 4. 3. Treg a zabíjení makrofágů	19
4. 5. Suprese efektorových buněk IL-2 cytokinovou deprivací	21
4. 5. 1. Treg a ovlivnění produkce mRNA pro IL-2 efektorovými buňkami	21
4. 5. 2. Treg a suprese produkce IL-2 efektorovými buňkami vyvazováním IL-2.	22
5. Materiály a metody	24
5.1. Zvířata	24
5.2. Roztoky a média	24
5.3. Izolace a kultivace buněk	24
5.4. Magnetická separace	25
5.5. Průtoková cytometrie	26
5.5.1. Charakterizace Treg a CD4 ⁺ CD25 ⁺ lymfocytů	26
5.5.2. Studium exprese kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul u makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg	27
5.5.3. Detekce apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg	27
5.6. Proliferační testy	28
5.6.1. Určení role makrofágů při supresi proliferace efektorových T lymfocytů	29
5.6.2. Proliferační testy v přítomnosti exogenního IL-2	29
5.6.3. Proliferační testy na ověření kostimulačních vlastností makrofágů	30
5.6.4. Proliferační testy na ověření role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů	30

5.7. Sledování produkce IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk	31
5.7.1. Kultivace buněk pro stanovení produkce IL-2 pomocí ELISA-testu.....	31
5.7.2. Stanovení produkce IL-2 pomocí ELISA-testu	32
5.8. Stanovení exprese genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk metodou q-PCR	33
5.8.1. Kultivace buněk pro q-PCR.....	33
5.8.2. Izolace RNA	33
5.8.3. Reverzní transkripce	34
5.8.4. q-PCR	34
5.9. Stanovení apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou Live cell imaging	35
5.10. Statistická analýza	35
6. Výsledky.....	36
6.1. Fenotypová charakterizace Treg a CD4 ⁺ CD25 ⁻ lymfocytů	36
6.2. Průkaz supresorové funkce Treg	37
6.3. Role makrofágů při supresi proliferace efektorových T lymfocytů	38
6.4. Exprese kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul u makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg.....	40
6.5. Testování kostimulačních vlastností makrofágů po inkubaci s Treg.....	42
6.6. Stanovení apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg	44
6.6.1. Detekce apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou průtokové cytometrie.....	44
6.6.2. Sledování apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou Live cell imaging	47
6.7. Ověření role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů	49
6.8. Porovnání produkce IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk	50
6.9. Exprese genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk	55
6.10. Suprese proliferace v přítomnosti exogenního IL-2.....	57
7. Diskuze	59
8. Závěr	64
9. Seznam Literatury	65

1. Seznam zkratek

APC	antigen presenting cells, buňky prezentující antigen
cAMP	cyclic adenosin monophosphate, cyklický adenosin monofosfát
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen, antigen cytotoxických T lymfocytů
DC	dendritic cells, dendritické buňky
Ebi3	Epstein-Barr-virus-induced gene 3
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina etylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FITC	fluorescein thioisocyanate, fluorescein thioisokyanát
FoxP3	forkhead box P3
GITR	glucocorticoid-induced TNFR-related protein, glukokortikoid-indukovaný protein z rodiny receptorů TNFR
GVHD	graft-versus-host disease, reakce štěpu proti hostiteli
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin, interleukin
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
mAb	monoclonal antibody, monoklonální protilátka
MHCII	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PE-Cy5	phycoerythrin-cyanin 5, fykoerytrin konjugovaný s cyaninem 5
PI	propidium iodide, propidium iodid
PS	phosphatidylserine, fosfatidylserin
TCR	T-cell receptor, T buněčný receptor
TGF- β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β

TNFR	tumor necrosis factor receptors, rodina receptorů faktoru nekrotizujícího nádory
TNF- α	tumour necrosis factor α , faktor nekrotizující nádory α
Treg	regulatory T-cell, regulační T buňky
WT	wild-type, divoký typ

2. Úvod

Imunitní systém je velmi účinný v boji organismu proti infekci. Jeho fungování však musí být přísně regulováno. Imunitní systém se nesmí aktivovat příliš a reagovat na neškodné antigeny, ani nesmí být aktivován málo a nechat podlehnout organismus patogenům. Jedním z hlavních mechanismů regulace, které se starají o adekvátní míru a trvání imunologických reakcí, jsou Treg. Treg je mnoho různých populací. Nejznámější jsou $CD4^+CD25^+$ regulační T buňky. Treg mají na svém povrchu molekulu CD4, koreceptor T buněčného receptoru (TCR). Charakteristická je pro ně vysoká exprese molekuly CD25, jsou tedy $CD25^{high}$. CD25 je α podjednotka receptoru pro IL-2. Dalším charakteristickým znakem myších Treg je přítomnost transkripčního faktoru FoxP3 (forkhead box P3). Fenotyp charakteristický pro Treg je tedy $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$.

Makrofágy jsou důležitým spojníkem mezi přirozenou a adaptivní imunitní odpovědí. Při adaptivní imunitní odpovědi fungují jako antigen prezentující buňky (APC), fagocytují různé cizorodé i vlastní částice, zpracují je a vystaví na molekule hlavního histokompatibilního komplexu třídy II (MHCII). Produkci různých cytokinů k sobě přitahují lymfocyty a interagují s nimi. T lymfocyty pro svoji aktivaci potřebují dostat aktivační signál přes TCR a druhý signál přes molekulu CD28. Makrofágy tento druhý signál poskytují svými kostimulačními molekulami CD80/CD86. Takto plně aktivované lymfocyty spustí adaptivní imunitní odpověď. S T lymfocyty makrofágy také interagují pomocí molekuly CD40. Tato interakce aktivuje makrofágy ještě více. Charakteristickou molekulou pro myší tkáňové makrofágy je glykoprotein F4/80 (Austyn a Gordon 1981). Monocyty, což jsou nezralé prekurzory makrofágů, mají tento glykoprotein v menší míře (Gordon et al. 1992). Další APC jsou dendritické buňky (DC), které jsou více specializované na prezentaci antigenu než makrofágy a pomáhají při adaptivní imunitní odpovědi.

3. Cíle diplomové práce

Studium mechanismů působení Treg je velmi důležitým tématem výzkumu. Poznání těchto mechanismů by mohlo vést k jejich úspěšnému klinickému využití v transplantační imunologii, alergologii, u autoimunitních onemocnění a v dalších medicínských oborech. Ze současných poznatků vyplývá, že supresorové mechanismy Treg jsou velmi komplexním, obsáhlým a různorodým problémem. Tato práce si klade za cíl určit mechanismus suprese proliferace různě stimulovaných efektorových lymfocytů a determinovat, zda se mechanismus a míra suprese při různých způsobech aktivace efektorových lymfocytů liší v závislosti na přítomnosti makrofágů. Dalším cílem je popsat příčiny rozdílné suprese v modelech bez makrofágů a s makrofágy a získané výsledky porovnat s již publikovanými výsledky. Dalším cílem je také určení mechanismu působení Treg při různých způsobech aktivace efektorových lymfocytů, aby se tyto modely mohly stát ověřeným základem pro další práci.

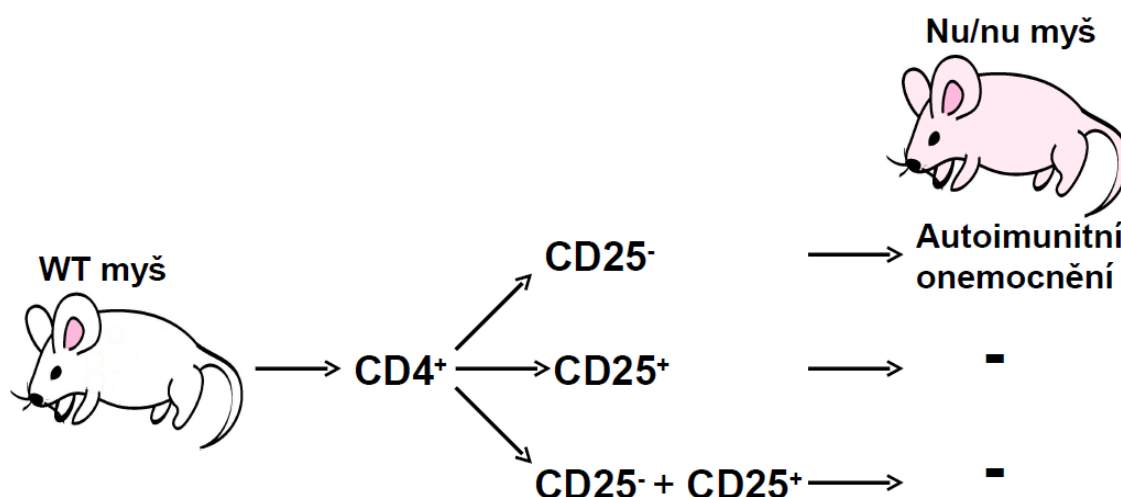
4. Literární přehled

4. 1. Historie Treg

První pozorování supresorové populace T lymfocytů, bylo zaznamenáno roku 1970 (Gershon a Kondo 1970). Po dobu 15 let byly tyto buňky intenzivně studovány, ale kvůli nedokonalosti metod je nebylo možno dostatečně charakterizovat.

Další krok směrem k přesnějšímu vymezení supresorových buněk byl učiněn v roce 1985. Populace supresorových buněk byla vymezena pomocí molekuly CD5. CD5 je adhesivní molekula, běžně se nacházející na povrchu 90 % T lymfocytů a určité menší populace B lymfocytů. Pokud byly CD5^{low} buňky ze zdravé myši přenesené do imunodeficientní myši, indukovaly u ní autoimunitní onemocnění. Pokud byly však CD5^{low} buňky přenesené spolu s CD5^{high} populací, autoimunitní onemocnění se nerozvinulo. Toto pozorování naznačovalo, že populace CD5^{high} buněk má supresorové vlastnosti (Sakaguchi et al. 1985). CD5 molekula však není kvůli svému širokému výskytu vhodná pro vymezení určité malé populace supresorových buněk a supresorové T lymfocyty byly dále pouze málo studovány.

K přesnějšímu fenotypovému vymezení Treg došlo až v roce 1995. Supresorové buňky byly charakterizovány jako CD4⁺CD25^{high} T lymfocyty. Přenesení CD4⁺CD25⁻ lymfocytů z wild-type (WT) myši do athymické nu/nu myši způsobilo po její imunizaci antigenem silnou imunitní odpověď vedoucí k autoimunitnímu onemocnění. Nu/nu myš nemá v důsledku nepřítomnosti thymu T lymfocyty. Přenesení CD4⁺CD25⁺ lymfocytů autoimunitní onemocnění po stimulaci antigenem nezpůsobilo. Přenesení CD4⁺CD25⁺ lymfocytů spolu s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty zabránilo vzniku autoimunitního onemocnění (Obr. 1). Treg byly tedy definovány pomocí CD25 molekuly, a byly ověřeny jejich supresorové vlastnosti (Sakaguchi et al. 1995).



Obr. 1: Schéma pokusu Sakaguchiho z roku 1995. Pokud byly přeneseny CD4⁺CD25⁻ lymfocyty z WT myši do athymické nu/n myši, způsobily po její stimulaci antigenem silnou reakci, která vedla k rozvoji autoimunitních onemocnění. Po přenesení populace CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů se autoimunitní onemocnění nerozvinulo. Přenesení této CD4⁺CD25⁺ populace spolu s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty zabránilo rozvoji autoimunitních onemocnění po stimulaci nu/n myši antigenem.

V roce 2001 byl popsán transkripční faktor FoxP3 a v roce 2003 byl definován jako nejdůležitější typický znak pro myší Treg. Myš FoxP3^{-/-} je postižena lymfoproliferativními autoimunitními onemocněními a nemá téměř žádné CD4⁺CD25⁺ lymfocyty. Přenesení CD4⁺CD25⁺ lymfocytů ze zdravé WT myši lymfoproliferativní onemocnění zastaví. Transkripční faktor FoxP3 je nezbytný pro vývoj a funkci Treg a u myši slouží jako jejich nejdůležitější fenotypový znak (Schubert et al. 2001, Fontenot et al. 2003).

4. 2. Fenotypová charakterizace Treg

Treg jsou CD4⁺ lymfocyty s konvenčním α/β TCR. Vyznačují se vysokou expresí CD25 molekuly, což je α podjednotka receptoru pro IL-2, zodpovědná za vyvazování IL-2. Další podjednotky tohoto receptoru jsou β a γ signální podjednotky. Podjednotka γ je společná pro více cytokinových receptorů - IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R a IL-21R. Treg mají na svém povrchu všechny tři podjednotky IL-2 receptoru, mají tedy plně funkční IL-2 receptor. Treg jsou na přítomnosti IL-2 závislé, bez jeho přítomnosti umírají (Malek et al. 2002).

Zatím nejlepší typický znak pro myši Treg je transkripční faktor FoxP3. Je to oligomerní, acetylovaný a fosforylovaný protein, který se skládá do složitěho komplexu. Tento regulátor transkripce byl objeven u Scurfy myši, která vykazuje fenotyp nadměrné proliferace lymfocytů bez regulace a FoxP3 je u ní defektní (Brunkow et al. 2001). V roce 2003 byl určen jako klíčový faktor pro vývoj a funkci Treg (Fontenot et al. 2003).

Další velmi důležitá molekula na povrchu Treg je antigen cytotoxických T lymfocytů 4 (CTLA-4). CTLA-4 je strukturní homolog kostimulační molekuly CD28 a stejně jako CD28 váže kostimulační molekuly CD80, CD86 na povrchu APC. Funkčně je ovšem antagonistou CD28 a po vazbě s ligandem inhibuje pomocí fosfatáz spuštění aktivační signální kaskády. Na rozdíl od CD28 molekuly se objevuje na povrchu až po aktivaci lymfocytu, s maximem exprese mezi 2. a 3. dnem (Linsley et al. 1992), kdy zabráňuje přílišné aktivaci T lymfocytu. Treg však mají CTLA-4 na svém povrchu konstitutivně (Read et al. 2000). Zdá se také, že je velmi důležitý pro jejich supresorovou funkci (Takahashi et al. 2000).

Treg mají na svém povrchu také glukokortikoid-indukovaný protein (GITR) z rodiny receptorů faktoru nekrotizujícího nádory (TNFR). Jeho působení při supresi Treg není plně objasněné. Signalizace přes GITR ruší Treg zprostředkovanou supresi, buď přímým tlumením Treg nebo stimulací efektorových buněk, které tak překonají supresi Treg (Shevach a Stephens 2006).

4. 3. Supresorové mechanismy Treg

Problematika Treg supresorových mechanismů je velmi komplexní a složitá. Zdá se, že jinak Treg působí v in vivo a in vitro modelech. Je mnoho popsáných mechanismů, z nichž některé jsou potvrzené pouze jedním článkem. Díky

množství různých protichůdných informací je velmi obtížné určit model suprese, který by byl nejvíce vhodný pro ovlivnění a použití Treg v klinické praxi.

4. 3. 1. Mechanismus suprese Treg in vitro

In vitro bylo ukázáno, že Treg suprese je závislá na buněčném kontaktu a neprobíhá přes rozpustné tlumivé cytokiny IL-4, IL-10 a transformující růstový faktor β (TGF- β). Přidání protilátek proti těmto cytokinům supresi nezabránilo. Pokud byly Treg od efektorových lymfocytů oddělené semipermeabilní membránou, suprese nenastala. In vitro se působení Treg zdá být závislé na kontaktu (Takahashi et al. 1998).

Na kontaktu závislý, ale i TGF- β závislý mechanismus suprese byl ukázán v roce 2001. Přidání monoklonální protilátky (mAb) anti-TGF- β 1 eliminovalo supresi zprostředkovanou Treg. Na povrchu Treg, ne však CD4⁺CD25⁻ lymfocytů, bylo dále nalezeno velké množství TGF- β 1 vázaného na membránu (Nakamura et al. 2001).

Toto tvrzení bylo ale vzápětí vyvráceno, když bylo ukázáno, že Treg z TGF- β 1^{-/-} myši vykazují normální supresorovou schopnost. Stejně tak myši Smad3^{-/-}, které mají přerušenu TGF- β 1 signalizaci. Přidání dvou různých typů protilátek proti TGF- β 1 do kultury neovlivnilo Treg supresorové vlastnosti (Piccirillo et al. 2002).

Již brzy po objevení Treg byla jako jeden z možných mechanismů působení popsána suprese produkce IL-2 efektorovými lymfocyty. Treg buď tlumí produkci IL-2 efektorovými buňkami přímo na úrovni exprese genu pro IL-2, nebo vychytávají již vytvořený IL-2 a kompetují s efektorovými lymfocyty o tento důležitý aktivační cytokin. Tento mechanismus Treg suprese je široce přijímaným a zdá se být velmi důležitý. Proto bude popsán samostatně v zvláštní kapitole.

Další možný mechanismus suprese závislý na kontaktu je zabíjení efektorových lymfocytů. O cytotoxických schopnostech Treg je rozepsáno více v další kapitole.

V roce 2007 bylo ukázáno, že Treg tvoří s efektorovými lymfocyty spojení formou nexů, kterými proudí do efektorových lymfocytů cyklický adenosin monofosfát (cAMP) a inhibuje je. Treg měly velkou zásobu cAMP, která po aktivaci ještě vzrostla. CD4⁺ efektorové lymfocyty kultivované samotné měly cAMP málo, ale CD4⁺ lymfocyty utlumené Treg ho obsahovaly velké množství. Treg se s efektorovými lymfocyty propojily nexy a předaly jim část ze svých velkých zásob

cAMP. Jak již bylo dříve ukázáno, zvýšená koncentrace cAMP v efektorových lymfocytech vede k inhibici produkce IL-2 (Bodor et al. 2001). Efektorové lymfocyty měly tedy sníženou schopnost produkce IL-2 a tento významný stimulační cytokin jim chyběl k aktivaci (Bopp et al. 2007).

Treg také mohou působit na efektorové lymfocyty pomocí molekuly CTLA-4 přes kostimulační molekuly CD80 a CD86. T lymfocyty 12-24 hodin po aktivaci zvyšují expresi těchto molekul, i když jich mají mnohem méně než APC. Proliferaci efektorových lymfocytů z dvojité deficitní CD80/CD86^{-/-} myši Treg netlumily. CD4⁺ lymfocyty přenesené z této myši do Rag^{-/-} myši (myš nemá T ani B lymfocyty), způsobily autoimunitní lymfoproliferativní onemocnění. Treg obsažené v této populaci nedokázaly utlumit proliferaci ostatních efektorových lymfocytů (Paust et al. 2004).

Treg neovlivňují in vitro jen efektorové lymfocyty, ale i APC. Působení Treg na APC, konkrétně na makrofágy, je věnováno několik dalších kapitol.

4. 3. 2. Mechanismy suprese Treg in vivo

Přestože se ve své práci modely in vivo nezabývám, shrnu zde několik nejdůležitějších poznatků o mechanismech působení Treg in vivo

Ačkoliv in vitro se zdá suprese produkce IL-2 důležitým mechanismem působení Treg, in vivo se poznatky liší. Myš IL-2^{-/-} i myš IL-2R^{-/-} má T lymfocyty, které i přes nepřítomnost IL-2 silně proliferují. Proliferace T lymfocytů in vivo je tedy velmi efektivní i bez IL-2 (Schorle et al. 1991). Treg navíc dokáží zabránit lymfoproliferativním autoimunitním onemocněním u IL-2R^{-/-} myši a tlumí tak in vivo proliferaci efektorových lymfocytů i bez IL-2 (Malek et al. 2002).

Zdá se, že interakce mezi CTLA-4 molekulou a CD80/CD86 molekulami na efektorových lymfocytech se uplatňuje i in vivo. Byl proveden přenos T lymfocytů z alogenních dárců, z nichž jeden byl CD80/CD86^{-/-} a druhý měl naopak zvýšenou expresi CD86 molekul specificky pouze na T lymfocytech. U příjemce T lymfocytů z CD80/CD86^{-/-} myši se rozvinula reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) rychleji než u příjemce lymfocytů kontrolní myši. Naopak příjemce lymfocytů z myši s vysokou expresí CD86 na T lymfocytech GVHD probíhala pomaleji a mírněji. T lymfocyty z deficitní myši nebyly suprimované Treg, na rozdíl od lymfocytů z myši s vysokou expresí CD86. (Taylor et al. 2004). Tato interakce mezi Treg a T lymfocyty byla popsána znovu ve stejném roce (Paust et al. 2004). Tyto

výsledky tedy naznačují zapojení molekuly CTLA-4 a CD80, CD86 molekul v mechanismech působení Treg in vivo.

Jako jeden z mechanismů působení Treg in vivo byl popsán IL-35. Treg mají vysokou expresi Ebi3 genu (Epstein-Barr-virus-induced gene 3) a IL-12 α podjednotky. Ostatní aktivované CD4⁺ lymfocyty tuto vysokou expresí nemají. Treg, ne však ostatní aktivované lymfocyty, také produkují velké množství Ebi3-IL-12 α heterodimeru. Tento heterodimer byl popsán jako IL-35. Treg z Ebi3^{-/-} a IL-12 α ^{-/-} myši mají sníženou supresorovou kapacitu in vitro a in vivo nezabrání indukci zánětlivé střevní choroby, na rozdíl od Treg z WT myši (Collison et al. 2007). Tento článek zatím zůstává ojedinělý, naopak bylo ukázáno, že lidské Treg neprodukují žádný IL-35 (Bardel et al. 2008).

4. 4. Treg a jejich působení na makrofágy

Treg ovlivňují různé buňky na různých anatomických místech těla. Jedním z ovlivňovaných buněčných typů jsou i APC. APC hrají klíčovou roli v iniciaci, regulaci a udržování imunitní odpovědi. Prezentují antigen a poskytují kostimulační signál pomocí molekul CD80 a CD86 T lymfocytům a pomocí molekuly CD40 B lymfocytům. Jejich interakce s Treg by mohla být důležitá pro ovlivnění a terapii mnoha imunitních onemocnění. Makrofágy jsou prostředníkem mezi vrozenou a adaptivní imunitou a jejich ovlivňování T regulačními buňkami je důležitý příklad, jak adaptivní imunita interaguje s imunitou přirozenou.

4. 4. 1. Treg a ovlivnění produkce cytokinů makrofágy

V první fázi zánětlivé imunitní odpovědi se uplatňují takzvaně "klasicky aktivované" makrofágy. Tyto makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny a reaktivní kyslíkové radikály. In vitro se diferencují po přidání lipopolysacharidu (LPS) a interferonu γ (IFN- γ) k neaktivovaným makrofágům. Model aktivace LPS používáme i v naší práci. Dále existují "alternativně aktivované makrofágy" účastníci se pozdní fáze imunitní reakce. Tyto makrofágy se zdají být regulačními, produkují protizánětlivé cytokiny a mají vysokou fagocytickou aktivitu. In vitro se vyvíjejí po stimulaci makrofágů IL-4, IL-10 nebo glukokortikoidy (Stein et al. 1992, Buechler et al. 2000).

V roce 2005 byla ukázána snížená produkce prozánětlivého cytokinu faktoru nekrotizujícího nádory α (TNF- α) u monocytů/makrofágů kultivovaných s Treg a jejich snížená schopnost po stimulaci LPS produkovat zánětlivé cytokiny

IL-6 a TNF- α . Monocyty/makrofágy samotné neprodukovaly téměř žádné cytokiny, v přítomnosti CD4⁺CD25⁻ lymfocytů bylo v kultuře zjištěno velké množství TNF- α , IFN- γ i IL-10. Za přítomnosti Treg v kultuře bylo zaznamenáno pouze malé množství těchto cytokinů. V tomto pokusu byly testovány pouze tyto tři cytokiny a nebylo nijak rozlišeno, zda se jedná o cytokin produkovaný monocyty/makrofágy nebo přidanými T lymfocyty. V navazujícím pokusu byla testována schopnost pouze monocytů/makrofágů produkovat cytokiny IL-6, TNF- α a IL-10 po stimulaci LPS. Monocyty/makrofágy byly kultivovány s Treg nebo s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty, separovány a aktivovány LPS. Samotné monocyty/makrofágy produkovaly velké množství všech tří cytokinů, s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty produkovaly větší nebo stejné množství IL-6 a TNF- α ale produkce IL-10 byla mírně snížena. Makrofágy s Treg produkovaly pouze velmi malé množství IL-6 a TNF- α , zatímco produkce IL-10 byla stejná. Treg tedy signifikantně snížily produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α , ne však protizánětlivého cytokinu IL-10, po stimulaci LPS u makrofágů. Treg by tedy mohly spíše modulovat produkci makrofágových cytokinů protizánětlivým supresorovým směrem, než ji úplně tlumit (Taams et al. 2005).

Další výzkum v této oblasti tuto hypotézu potvrdil. Zdá se, že Treg mají schopnost diferencovat makrofágy směrem k alternativní aktivaci, tedy k jejich regulačním funkcím, spíše než plošně inhibovat produkci jejich cytokinů. Monocyty/makrofágy kultivované s Treg zvýšily expresi CD206 (makrofágový manosový receptor) a CD163 (hemoglobin scavenger receptor), dvou molekul typických pro "alternativně aktivované makrofágy". Tyto monocyty/makrofágy také vykazovaly zvýšenou fagocytickou aktivitu a téměř neodpovídaly na stimulaci LPS produkcí prozánětlivých (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8) cytokinů. Naopak tyto makrofágy produkovaly protizánětlivé cytokiny IL-1Ra a IL-10. Makrofágy kultivované s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty vykazovaly zvýšenou produkci obou typů cytokinů. Tyto výsledky ukazují, že Treg netlumí produkci všech cytokinů, ale spíše posouvají rovnováhu směrem k protizánětlivé reakci (Tiemessen et al. 2007).

V souladu s tímto tvrzením je také práce z roku 2006, kde byla ukázána vyšší produkce IL-10 u makrofágů prekultivovaných s Treg než u makrofágů prekultivovaných s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty. Monocyty/makrofágy prekultivované s Treg také vykazovaly výrazně sníženou schopnost aktivovat proliferaci CD4⁺CD25⁻ lymfocytů stimulovaných mAb anti-CD3 a anti-CD28. Monocyty/makrofágy prekultivované samotné nebo s kontrolními CD4⁺CD25⁻ lymfocyty proliferaci významně stimulovaly. Treg tedy makrofágy opět

nasměrovaly k regulační funkci a produkci protizánětlivých cytokinů (Kryczek et al. 2006). U všech článků v této kapitole bylo pracováno s lidskými buňkami.

4. 4. 2. Treg a ovlivnění exprese makrofágových kostimulačních molekul

V roce 2000 bylo pozorováno u DC po kultivaci s Treg snížení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86. DC kultivované s Treg měly expresi těchto molekul nižší než DC kultivované v médiu samotné. Stejně snížení bylo pozorováno u B lymfocytů, kde byla navíc snižena exprese i molekuly CD40 (Cederbom et al. 2000).

Později, v roce 2005, byla testována exprese kostimulačních CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul na makrofázích. Makrofágy samotné měly velmi nízkou expresi molekul CD80 a CD40, exprese molekul CD86 a MHCII byla vyšší. Stejně výsledky byly pozorovány i u makrofágů kultivovaných s neaktivovanými Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocyty. Po kultivaci makrofágů s mAb anti-CD3 a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty se makrofágy aktivovaly a zvýšila se exprese CD40, CD80 a MHCII, zatímco exprese CD86 zůstala stejně vysoká. Pokud byly makrofágy kultivovány s mAb anti-CD3 a s Treg, exprese CD40, CD80 a MHCII molekul byla zvýšená v porovnání s makrofágy samotnými, ale nižší proti makrofágům kultivovaným s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty a anti-CD3. Exprese molekuly CD86 byla s Treg a mAb anti-CD3 překvapivě snižena oproti vysoké expresi u makrofágů samotných i s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty a anti-CD3. To by ukazovalo na aktivní mechanismus ovlivnění makrofágových kostimulačních molekul spíše než plošnou inhibici makrofágů v přítomnosti Treg (Taams et al. 2005).

Další práce byla provedena na DC. Treg kultivované s naivními lymfocyty a DC vytvořily kolem DC agregáty a znemožnily T lymfocytům přístup k DC. Dále také kultivace Treg s DC způsobila snížení exprese CD80 a CD86 molekul, ne však CD40 a MHCII molekul, na povrchu DC. Tento účinek byl CTLA-4 dependentní, Treg získané z CTLA-4^{-/-} myši toto snížení exprese nezpůsobovaly (Onishi et al. 2008).

4. 4. 3. Treg a zabíjení makrofágů

Jedním z možných mechanismů působení Treg by mohla být jejich schopnost zabíjet makrofágy. Bylo zjištěno, že lidské Treg po aktivaci mAb anti-CD3 vázanou na destičku a IL-2 zvýšily expresi granzymu A, ne však granzymu B. Aktivované Treg působily cytotoxicky na efektorové lymfocyty,

monocyty/makrofágy a DC. Mechanismus jejich účinku byl určen jako závislý na perforinu a nezávislý na FasL/FasR (Grossman et al. 2004a).

Naproti tomu v myším modelu bylo ukázáno, že po aktivaci mAb anti-CD3 a IL-2 Treg zvyšují expresi mRNA pro granzym B, nikoliv však pro granzym A ani perforin. Treg z granzym B^{-/-} myši měly sníženou schopnost suprese proliferace stimulovaných efektorových CD4⁺CD25⁻ lymfocytů. Treg z perforin^{-/-} myši nevykazovaly sníženou supresorovou kapacitu, což naznačuje neobvyklý způsob působení granzymu B bez perforinu. Když byly aktivované Treg kultivovány s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty, způsobily výrazné zvýšení počtu mrtvých lymfocytů. Cytotoxické působení Treg bylo v této práci testováno pouze na efektorových lymfocytech (Gondek et al. 2005).

Cytotoxické schopnosti Treg byly znovu potvrzeny v roce 2006. Treg aktivované IL-2 a mAb anti-CD3 inhibovaly proliferaci B lymfocytů aktivovaných LPS. Na aktivované efektorové CD4⁺ lymfocyty však cytotoxicky nepůsobily. Mechanismus cytotoxického účinku byl ukázán jako FasL/FasR nezávislý a granzym B závislý. Treg z perforin^{-/-} myši stále vykazovaly cytotoxickou aktivitu, avšak o třetinu sníženou než Treg z WT myši. Na cytotoxickém působení Treg se tedy perforin pravděpodobně z části podílí. Treg více zabíjely antigen prezentující B lymfocyty než obecně aktivované lymfocyty. Jiné APC v tomto článku testovány nebyly (Zhao et al. 2006).

In vivo byla role granzymu B potvrzena na granzym B^{-/-} myši. Tyto deficientní myši odhojovaly nádory rychleji a účinněji než WT myši. U WT myši byly v blízkosti nádoru nalezeny Treg exprimující granzym B a tlumící imunitní odpověď. Přenos WT Treg do granzym B^{-/-} myši obnovil růst nádoru, přenos Treg z deficientní myši nikoliv (Cao et al. 2007).

Jiný mechanismus ovlivnění monocytů/makrofágů Treg byl ukázán na lidském modelu v souvislosti se septickým šokem. Pacienti se septickým šokem měli na monocytech/makrofázích znatelný úbytek CD14 molekuly, což je LPS vázající část receptoru pro LPS. Úbytek CD14 molekuly koreloval s vážností septického šoku. Přidání LPS k monocytům v in vitro modelu zachovalo stejnou míru exprese CD14 molekuly, v přítomnosti Treg se exprese CD14 molekuly snižovala, až téměř zmizela. Již dříve bylo ukázáno, že apoptotické monocyty mají menší expresi CD14 molekuly (Heidenreich et al. 1997). Bez LPS tedy monocyty ztrácejí CD14 molekulu a více podléhají apoptóze. Dále bylo testováno, zda Treg zabraňují monocytům v LPS indukovaném přežití. Monocyty s vyšší expresí CD14

byly méně obarvené Annexinem V než molekuly s nízkou expresí CD14 molekuly. Annexin V je charakteristický znak pro apoptotické buňky. Treg zvyšovaly počet monocytů s nízkou CD14 expresí a vyšší expresí Annexinu V. Přidání FasL/FasR protilátek tuto schopnost Treg eliminovalo. Treg tedy inhibují LPS indukované přežití monocytů, a to pravděpodobně na FasR/FasL závislým způsobem (Venet et al. 2006).

4. 5. Suprese efektorových buněk IL-2 cytokinovou deprivací

4. 5. 1. Treg a ovlivnění produkce mRNA pro IL-2 efektorovými buňkami

Krátce po vymezení populace Treg byl zkoumán jejich mechanismus suprese proliferace efektorových $CD4^+CD25^-$ lymfocytů. Treg významně tlumily proliferaci efektorových lymfocytů vyvolanou rozpustnou mAb anti-CD3 a "pomocnými buňkami", tedy slezinným homogenátem zbaveným T lymfocytů. Tyto "pomocné buňky" sloužily v modelu jako APC. Proliferaci vyvolanou mAb anti-CD3 vázanou na kultivační destičku a "pomocnými buňkami" však netlumily. Přidání exogenního IL-2 nebo rozpustné mAb anti-CD28 do kultury, kde původně Treg tlumily, supresi eliminovalo. Stimulované efektorové $CD4^+CD25^-$ lymfocyty produkovaly IL-2. Po přidání Treg bylo množství IL-2 v kultuře významně sníženo. V přítomnosti Treg bylo změřeno i významně menší množství mRNA pro IL-2 než u $CD4^+CD25^-$ lymfocytů samotných. Ve všech zmiňovaných pokusech však nebyly použity kontroly s přidáním $CD4^+CD25^-$ lymfocytů místo Treg. Tyto výsledky ukazují supresi produkce IL-2 na úrovni mRNA (Thornton a Shevach 1998).

Stejný způsob suprese, tedy suprese produkce IL-2 efektorovými buňkami na úrovni mRNA, byl potvrzen stejnou skupinou později. V přítomnosti exogenního IL-2 Treg netlumily proliferaci efektorových lymfocytů. Pokud se ovšem sledovala tlumení exprese mRNA pro IL-2, tam Treg přepis mRNA pro IL-2 tlumily stejně jako bez přidání exogenního IL-2. Treg jsou tedy stále funkční, množství exogenního IL-2 však jejich supresi překoná. Přidání rozpustné mAb anti-CD28 také eliminuje supresi proliferace efektorových buněk, po jejím přidání Treg tlumí expresi mRNA pro IL-2 velmi málo nebo vůbec. Protilátka anti-CD28 spouští totiž v buňkách transkripci genu pro IL-2 (Fraser et al. 1991), a Treg nejsou schopné tuto indukci utlumit. Dalším důvodem, proč není pozorována suprese proliferace efektorových lymfocytů Treg v přítomnosti exogenního IL-2, je proliferace samotných Treg. Ty jsou totiž stimulované přítomnou mAb anti-CD3 a IL-2,

proliferují a přispívají k celkové proliferaci měřené metodou inkorporace ^3H thymidinu (Thornton et al. 2004).

Suprese produkce IL-2 na úrovni mRNA byla znovu testována v roce 2007. Bylo ukázáno, že Treg nezmenšují produkci mRNA pro IL-2 u efektorových buněk po 14, 36 a 48 hodinách. Bylo také změřeno množství intracelulárního IL-2 po 24 hodinové inkubaci efektorových lymfocytů s Treg a následné restimulaci ionomycinem, forbol myristil acetátem nebo anti-CD3. U žádného způsobu aktivace nebyl s Treg pozorován rozdíl v množství intracelulárního IL-2 proti kontrole. Tento výsledek ukazuje spíše na možnost vyvazování IL-2 Treg. Treg vyvázaly výrazně více fúzního proteinu IL-2 než srovnatelné množství aktivovaných lymfocytů. Treg také vyvázaly cytokin IL-4. Treg tedy pravděpodobně kompetují s efektorovými lymfocyty o cytokiny, které efektorové lymfocyty potřebují pro svůj růst a přežití (Pandiyan et al. 2007).

Testováním vztahu Treg, efektorových lymfocytů a IL-2 v matematických počítačových modelech bylo ukázáno, že Treg vyvazují IL-2 produkováný efektorovými buňkami, ale pouze do určité malé vzdálenosti buněk a do určité míry produkce IL-2. Pokud byly efektorové lymfocyty stimulovány silně a bylo jich mnoho, jejich deprivace způsobená vychytáním IL-2 Treg se neobjevila. V diskuzi autoři upozorňují na možný primární mechanismus suprese produkce IL-2 efektorovými lymfocyty na genové úrovni, po němž až nastupuje kompetice o zbylý IL-2 (Busse et al. 2010).

4. 5. 2.Treg a suprese produkce IL-2 efektorovými buňkami vyvazováním IL-2

V roce 2004 byl popsán mechanismus suprese proliferace efektorových lymfocytů Treg kompeticí o IL-2. Pokud byla protilátkou zablokována CD25 molekula a CD122 molekula (β podjednotka receptoru pro IL-2) na povrchu Treg, jejich supresorové schopnosti byly eliminovány. Treg vázaly, na rozdíl od neaktivovaných lymfocytů, IL-2-fúzní protein i bez aktivace. Po aktivaci ho vázaly ještě více. Bylo provedeno porovnání množství CD25 molekuly po stimulaci u $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ lymfocytů, Treg a obou typů dohromady. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ lymfocyty proliferovaly a zvyšovaly expresi molekuly CD25. Pokud byly přítomné Treg, proliferace efektorových lymfocytů i indukce exprese CD25 molekuly byla utlumená. I když určité množství efektorových lymfocytů stále proliferovalo, nebyla u nich žádná exprese CD25. Treg v přítomnosti efektorových lymfocytů naopak exprimovaly 6 - krát více CD25 molekuly než když byly kultivovány samy. Přidání

exogenního IL-2 do kultury supresi eliminovalo a u efektorových lymfocytů byla obnovena exprese CD25 molekuly. Přidání exogenního IL-2 do kultury také obnovilo produkci IL-2 v samotných efektorových lymfocytech a nepůsobilo tak pouze z vnějšku. Tento výsledek naznačuje, že Treg netlumí zcela produkci IL-2 efektorovými lymfocyty, ale selektivně malé množství vyprodukovaného IL-2 vyvazují a kompetují tak s efektorovými lymfocyty o IL-2 (de la Rosa et al. 2004).

Tyto výsledky byly potvrzeny o rok později. Treg byly kultivovány s B buněčnou myelomovou linií, transfekovanou cDNA pro IL-2 bez regulačních sekvencí. Byl pozorován úbytek v množství IL-2 v kultuře myelomových buněk s Treg, ne však s $CD4^+CD25^-$ lymfocyty. V kultuře $CD4^+CD25^-$ efektorových lymfocytů stimulovaných anti-CD3 s Treg bylo snižené množství IL-2 i snížená proliferace efektorových buněk. Exprese mRNA pro IL-2 v efektorových lymfocytech byla nejvyšší po 5 hodinách inkubace, v přítomnosti Treg byla exprese mRNA v efektorových buňkách velmi snižená. Množství IL-2 v supernatantu bylo celou dobu kultivace s Treg nedetekovatelné, na úrovni intracelulárního proteinu se ale produkce IL-2 v efektorových lymfocytech po celou dobu postupně zvyšovala. I přesto, že Treg tlumí produkci IL-2 na úrovni mRNA, určité množství IL-2 proteinu vznikne a začne se uvolňovat. Treg ho ale vyváží a v supernatantu není detekovatelný. Dále byly v in vivo modelu studovány fenotypové důsledky této kompetice o IL-2 pro efektorové lymfocyty a Treg. Exprese CD25 molekuly je závislá na IL-2 (Kim et al. 2001). Pokud byly do Rag^{-/-} myši, přeneseny naivní $CD4^+$ lymfocyty, po určité době se část aktivovala a exprimovala CD25 molekulu. Přenesení Treg spolu s těmito lymfocyty tuto expresi CD25 molekuly potlačilo, Treg vyvázaly IL-2 a nedošlo k expresi CD25 molekul na efektorových lymfocytech. Po přenesení Treg samotných v důsledku nedostatku IL-2 část z nich ztratila svoji CD25 molekulu. Tyto výsledky získané in vivo ukazují důležitost IL-2 pro Treg a jejich schopnost ho vyvazovat a soutěžit o něj s efektorovými lymfocyty (Barthlott et al. 2005).

Znovu bylo potvrzeno, že Treg způsobují IL-2 deprivaci efektorových lymfocytů. V kultuře efektorových lymfocytů s Treg bylo velmi málo IL-2 oproti kontrole. Pokud byly Treg od efektorových lymfocytů odděleny membránou, k snížení množství IL-2 v kultuře nedošlo. To by znamenalo buď nutnost kontaktu, nebo již dříve zmíněnou (Busse et al. 2010) požadovanou malou vzdálenost. V článku nebyl testován mechanismus úbytku IL-2, bylo předpokládáno vyvazování (Wang et al. 2010).

5. Materiály a metody

5.1. Zvířata

V pokusech byly použity inbrední myši kmene BALB/c ve věku 2-3 měsíců obou pohlaví, získané z chovu Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AVČR).

5.2. Roztoky a média

Ke kultivaci buněk bylo použito médium RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), doplněné 5 % nebo 10 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (FCS, Sigma), penicilinem (100 U/ml, Sigma), streptomycinem (100 µg/ml, Sigma), 2-merkaptetanolem (5×10^{-5} M, Serva, Heidelberg, Germany) a HEPES pufrem (10 mM, Sigma). Toto médium je dále nazýváno jako kompletní RPMI 1640 médium.

Při některých pokusech byl použit fosfátový pufr (PBS), obsahující 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,15 g Na_2HPO_4 na 1 l destilované vody, připravený servisní laboratoří ÚMG AV ČR.

Pro ELISA-test (enzyme-linked immunosorbent assay) byl použit roztok PBS s Tween 20 (Sigma), připravený přidáním 0,5 ml Tween 20 do 1 l PBS.

Na uvolnění adherovaných buněk (makrofágů) byl použit roztok 0,01 µM kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA, Sigma) v PBS smíchaný s 10 % kompletním RPMI 1640 médiem 1:1, dále označovaný jako roztok EDTA 1:1.

5.3. Izolace a kultivace buněk

Treg a $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ lymfocyty byly získány z homogenizované sleziny dvoustupňovou magnetickou separací. Slezina byla sterilně odebrána z myši BALB/c a homogenizována ve skleněném homogenizátoru v kompletním 5 % RPMI 1640 médiu. Získaná suspence byla přefiltrována přes sterilní nylonovou gázu a centrifugována (8 minut, 300g). Peleta byla resuspendována v kompletním 5 % RPMI médiu a buňky byly spočítány v Bürkeho komůrce. Následovala magnetická separace.

Makrofágy byly získány opakovaným promýváním peritonea 10 ml 5 % kompletního RPMI 1640 média pomocí injekční stříkačky. Buňky byly centrifugovány (8 minut, 300g) a resuspendovány v 10 % kompletním médiu RPMI

1640. Buňky byly dvě hodiny inkubovány v Petriho miskách o průměru 6 cm (Falcon, Oxnard, CA) v inkubátoru. Po dvou hodinách byly předeřhřátým médiem odmyty neadherované buňky a adherentní makrofágy byly kultivovány 15 minut v inkubátoru s roztokem EDTA 1:1. Dále byly makrofágy šetrně odebrány a stočeny (8minut, 300g). V Bürkeho komůrce byl určen jejich počet.

Všechny buňky byly inkubovány za teploty 37° C a 5 % koncentrace CO₂ v inkubátoru Sanyo (Osaka, Japan).

5.4. Magnetická separace

Magnetická separace byla užita pro získání Treg lymfocytů a CD4⁺CD25⁻ lymfocytů z homogenátu sleziny. Pro separaci byl použit magnetický separátor AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Při separaci se pracovalo se sadou pro izolaci CD4⁺CD25^{high} lymfocytů - Treg (Miltenyi Biotec).

Buněčná slezinná suspenze byla po centrifugaci převedena do autoMACS pufru (Miltenyi Biotec). Na každých 10⁷ lymfocytů bylo přidáno 40 μl pufru. Poté bylo přidáno 10 μl směsi protilátek značených biotinem na každých 10⁷ lymfocytů a směs byla inkubována 10 minut ve tmě při 4° C. Směs protilátek obsahuje mAb protilátky anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b a anti-Ly76. Jediné buňky, které zůstanou neoznačeny, jsou CD4⁺ lymfocyty.

V dalším kroku bylo přidáno 30 μl autoMACS pufru, 20 μl magnetických mikrokuliček konjugovaných s avidinem (anti-biotin) a 10 μl anti-CD25 protilátky značené fykoerytrinem (PE) na každých 10⁷ buněk. Směs byla inkubována dalších 15 minut ve tmě při 4° C. Po inkubaci bylo přidáno 1-2 ml autoMACS pufru na každých 10⁷ buněk a buňky byly centrifugovány (8 minut, 300g). Peleta byla rozředěna v 500 μl autoMACS pufru a tato suspenze byla separována magnetickým AutoMACS Pro separátorem (Miltenyi Biotec) při programu Depl025.

V dalším kroku byla použita pouze nezačtená CD4⁺ frakce. Tyto buňky byly centrifugovány (8 minut, 300g) a peleta byla resuspendována v 90 μl autoMACS pufru na 10⁷ buněk. Na 10⁷ původního počtu lymfocytů a bylo přidáno 10 μl magnetických mikrokuliček konjugovaných s anti-PE protilátkou. Suspenze byla inkubována 15 minut ve tmě při 4° C. Po skončení inkubace byla suspenze promyta 1-2 ml autoMACS pufru na 10⁷ buněk a stočena (8 minut, 300g). Peleta byla resuspendována v 500 μl autoMACS pufru a vzniklá suspenze byla separována magnetickým AutoMACS Pro separátorem při programu Posseld2. Tímto druhým krokem separace byly získány 2 frakce, první nezačtené

CD4⁺CD25⁻ buňky a druhé označené CD4⁺CD25⁺ lymfocyty, tedy Treg. Negativní frakce CD4⁺CD25⁻ lymfocytů znovu stočena (8 minut, 300g), resuspendována v 500 µl autoMACS pufru (Miltenyi Biotec) a tříděna separátorem při programu Depl025 pro větší čistotu této populace.

5.5. Průtoková cytometrie

Metoda průtoková cytometrie byla použita v následujících pokusech:

- Fenotypová charakterizace Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocytů
- Studium exprese kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg
- Detekce apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg

Pro všechna měření byl použit průtokový cytometr BD LSRII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NY) a pro vyhodnocení byl použit software FlowJo 8.8.6 (Tree Star, Ashland, OR).

5.5.1. Charakterizace Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocytů

Obě vyseparované frakce lymfocytů byly centrifugovány (8 minut, 300g) a peleta byla resuspendovaná v PBS. Suspense byla rozpipetována po 200 µl do 96 jamkové mikrokultivační destičky s kulatým dnem (Nunc, Waltham, MA). Následně byla destička se vzorky stočena (3 minuty, 300g) a promyta znova PBS. Po další centrifugaci (3 minuty, 300g) byl PBS odcáknut a do každé jamky bylo přidáno 10 µl směsi protilátek - anti-CD4 (klon RM4-5, eBioscience, San Diego, CA) značená fluorescein thioisokyanátem (FITC), anti-CD25 (klon PC 61.5, eBioscience) značená allofykocyaninem a Live/Dead fixable Violet Dead Cells Stain Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) pro značení mrtvých buněk. Protilátky anti-CD4 a anti-CD25 byly naředěny na koncentraci 5 µg/ml a kit na označení mrtvých buněk byl naředěn dle pokynu výrobce 1:100.

Následovala 30 minutová inkubace v temnu při 4° C. Po skončení inkubace byly buňky dvakrát promyty PBS a stočeny (3 minuty, 300g) pro odstranění volných protilátek.

Ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl fixačně/permeabilizačního roztoku (fixačně/permeabilizační koncentrát ředěný 1:3 v ředícím fixačně/permeabilizačním pufru, eBioscience). Po inkubaci 30 minut při 4° C a v temnu byla destička dvakrát promyta roztokem permeabilizačního pufru naředěného 1:10 destilovanou vodou a centrifugována (3 minuty, 300g).

Dále bylo do každé jamky přidáno 10 μ l mAb anti-FoxP3 (klon FJK-16s, eBioscience) značené PE konjugovaným s cyaninem 5 (PE-Cy5) a naředěné na koncentraci 7 μ g/ml v roztoku permeabilizačního pufru. Po inkubaci 30 minut při 4° C následovalo dvojí promytí roztokem permeabilizačního pufru, centrifugace (3 minuty, 300g). Vzorky byly pro měření rozředěny ve 200 μ l roztoku permeabilizačního pufru.

5.5.2. Studium exprese kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul u makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg

Makrofágy byly vypláchnuty z peritonea, spočítány a nasazeny do 96 jamkové mikrokultivační destičky (Nunc) v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml. K části byl přidán LPS (Difco Laboratories, Detroit, MI) v koncentraci 1,5 μ g/ml, k části LPS a Treg v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml a k části LPS a $CD4^+CD25^-$ lymfocyty ve stejné koncentraci jako Treg. Část makrofágů byla ponechána pouze v médiu bez aktivace. Celkový objem na jamku byl 200 μ l. Po 24 hodinách byl odsát supernatant a zbylé adherované buňky byly uvolněny roztokem EDTA 1:1. Získané makrofágy byly centrifugovány (8 minut, 300g), resuspendovány v PBS a přeneseny po 200 μ l na jamku do 96 jamkové mikrokultivační destičky s kulatým dnem (Nunc). Buňky byly dvakrát promyty PBS a centrifugovány (3 minuty, 300g). Do každé jamky bylo přidáno 10 μ l směsi protilátek. V každé jamce byly označeny makrofágy protilátkou anti-F4/80 (klon BM8, BioLegend) značenou allofukocyaninem konjugovaným s cyaninem 7. Dále byly označeny kostimulační molekuly protilátkami - anti-CD80 (klon 16-10A, BioLegend) značená allofukocyaninem, anti-MHCII (klon NIMR-4, eBioscience) značenou FITC, anti-CD86 (klon GL-1, BioLegend) a anti-CD40 (klon 1C10, eBioscience) značené PE. Všechny protilátky byly naředěny na koncentraci 5 μ g/ml.

Destička byla inkubována ve tmě 30 minut při 4° C. Po skončení inkubace byly buňky v mikrokultivační destičce promyty 2x PBS a po závěrečném stočení (3 minuty, 300g) resuspendovány 150 μ l PBS. Ke značení mrtvých buněk byl použit Hoechst 33258 (Sigma), přidáný do jamky 10 minut před měřením.

5.5.3. Detekce apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg

Pro označení apoptotických buněk bylo využito faktu, že mají na svém povrchu membránový fosfolipid fosfatidylserin (PS), který je za normálních podmínek pouze ve vnitřní vrstvě buněčné membrány. Buňky mrtvé byly označeny

propidium iodidem (PI), který interkaluje do DNA. Buňky apoptotické byly označeny Annexinem V značeným FITC, který se váže na PS. Pro detekci apoptotické smrti byl použit Apoptosis Assay Kit - FITC (Exbio Praha, Vestec, ČR).

Makrofágy byly vypláchnuty z peritonea, spočítány a nasazeny do 96 jamkové kultivační destičky (Nunc) v koncentraci $0,5 \times 10^6/\text{ml}$. Byly ponechány buď samotné neaktivované, aktivované LPS (Difco) v koncentraci $1,5 \mu\text{g/ml}$ nebo aktivované LPS ($c=1,5 \mu\text{g/ml}$) s Treg v koncentraci $1 \times 10^6/\text{ml}$ nebo s $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ lymfocyty ze stejné koncentrace. Celkový objem v jamce byl $200 \mu\text{l}$. Po 24 hodinách byly adherované buňky uvolněny roztokem EDTA 1:1. Makrofágy byly centrifugovány (8 minut, 300g), resuspendovány v PBS a přeneseny po $200 \mu\text{l}$ na jamku do 96 jamkové mikrokultivační destičky s kulatým dnem (Nunc). Destička byla 1x promyta $150 \mu\text{l}$ PBS a centrifugována (3 minuty, 300g). Všechny jamky byly označeny $10 \mu\text{l}$ protilátky anti-F4/80 (klon BM8, BioLegend, San Diego, CA) značené allofykocyaninem konjugovaným s cyaninem 7 v koncentraci $5 \mu\text{g/ml}$. Následovala 30 minutová inkubace při 4°C ve tmě.

Po uplynutí inkubace byla destička promyta $200 \mu\text{l}$ PBS a centrifugována (3 minuty, 300g). Toto bylo provedeno ještě jednou. Poté byla každá jamka označena $30 \mu\text{l}$ mixu Annexinu V a PI naředěných 1:20 ve vazebném pufru. Vazebný pufr byl připraven z 10 x koncentrovaného pufru dodaného výrobcem zředěného ionizovanou vodou. Buňky byly značeny 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Destička byla centrifugována (3 minuty, 300g), peleta zředěna ve $150 \mu\text{l}$ vazebného pufru a ihned měřena na průtokovém cytometru.

5.6. Proliferační testy

Ve všech typech proliferačních testů byly buňky inkubovány 72 hodin. Všechny proliferační testy byly kvantifikovány mírou inkorporace značeného nukleotidu. Na posledních 6 hodin 72 hodinové inkubace bylo do každé jamky přidáno $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -thymidinu (Ústav pro výzkum radioizotopů, Řež, ČR). Po inkubaci byly buňky sklizeny na sběrači buněk Automash 2000 (Dynatech, Burlington, MA) a inkorporovaná aktivita byla měřena pomocí scintilačního roztoku obsahujícího toluen (Lachema a.s., Neratovice, ČR), 2,5-difenyloxazol (PPO), $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}$ o koncentraci 4 g/l (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), 4,4-bis[2-(4-metyl-5-fenyloxazolyl)]-benzen (POPOP), $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ o koncentraci 100 mg/l (Sigma) na scintilačním počítači (Beckman, LS6500, CA).

5.6.1. Určení role makrofágů při supresi proliferace efektorových T lymfocytů

CD4⁺CD25⁻ lymfocyty získané magnetickou separací byly inkubovány 72 hodin a jejich proliferace byla kvantifikována podle inkorporace značeného nukleotidu.

Do 96 jamkové mikrokultivační kultivační destičky (Nunc) byly CD4⁺CD25⁻ lymfocyty nasazeny v koncentraci $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ v kompletním 10 % RPMI 1640 médiu. V některých jamkách byly CD4⁺CD25⁻ lymfocyty kultivovány bez aktivace pouze v médiu. V jiných byly aktivovány různými způsoby (popsáno níže) a byly k nim přidány Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty jako kontrola z koncentrace $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ a $1 \times 10^6/\text{ml}$. Způsoby aktivace se lišily přítomností či nepřítomností makrofágů. Výsledný objem v jamce činil 200 μl .

Při základním způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí rozpustné mAb anti-CD3 (klon KT-3, Tomonari 1988) v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a makrofágů v koncentraci $0,025 \times 10^6/\text{ml}$.

V druhém způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vázanými na mikrokultivační 96 jamkovou destičku (Nunc). Protilátky byly naředěny do požadované koncentrace v PBS, rozpipetovány po 50 μl na jamku a destička byla inkubována v inkubátoru. Po 60 minutách byly protilátky odsáty a do destičky nasazeny CD4⁺CD25⁻ buňky.

V třetím způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ také vázanými na mikrokultivační 96 jamkovou destičku. Postup navázání protilátek na destičku byl stejný. Oproti předcházejícímu způsobu však byly přidány ještě makrofágy v koncentraci $0,025 \times 10^6/\text{ml}$.

5.6.2. Proliferační testy v přítomnosti exogenního IL-2

K průkazu, zda přidání IL-2 do kultury ovlivní supresorovou schopnost Treg, byl použit následující model. CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v koncentraci $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ byly aktivovány rozpustnou mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a makrofágy, přidány v koncentraci $0,025 \times 10^6/\text{ml}$. Do některých jamek byly přidány Treg nebo CD4⁺CD25⁻ v koncentraci $0,5 \times 10^6/\text{ml}$. Dále byl do jamek s přidáním Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty přidán myší rekombinantní IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) nebo lidský rekombinantní IL-2

(ImmunoTools). Byly použity tři koncentrace IL-2 - 50, 25 a 12,5 ng/ml. Výsledný objem byl 200 μ l na jamku.

5.6.3. Proliferační testy na ověření kostimulačních vlastností makrofágů

Při prvním způsobu kultivace byly makrofágy, získané opakovaným výplachem peritonea, 2 hodiny kultivované v Petriho misce o průměru 6 cm (Falcon), po dvou hodinách uvolněny roztokem EDTA 1:1 a spočítány v Bürkeho komůrce. Dále byly nasazeny v koncentracích $0,3 \times 10^6$ /ml, $0,15 \times 10^6$ /ml a $0,075 \times 10^6$ /ml do mikrokultivační 96 jamkové destičky (Nunc). V některých jamkách byly kultivovány samy, do některých byly přidány Treg v koncentraci $0,3 \times 10^6$ /ml a do některých jako kontrola $CD4^+CD25^-$ lymfocyty o stejné koncentraci jako Treg. Buňky byly kultivovány v inkubátoru 24 hodin.

Po 24 hodinách byly jamky třikrát promyty předeřátým médiem a všechny neadherované buňky byly opláchnuty. Do destičky bylo přidáno 100 μ l $CD4^+CD25^-$ lymfocytů z koncentrace $0,5 \times 10^6$ /ml a rozpustná mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly aktivovány přítomností adherovaných makrofágů a přidané mAb anti-CD3.

Při druhém způsobu nasazení pokusu byly makrofágy inkubovány na Petriho misce o průměru 6 cm (Falcon) po dobu 24 hodin s Treg či $CD25^-$ v poměru 1:1. Neadherované buňky byly opláchnuty předeřátým médiem a zbylé makrofágy byly uvolněny roztokem EDTA 1:1. Makrofágy byly stočeny, resuspendovány v čerstvém kompletním 10 % RPMI 1640 mediu a spočítány v Bürkeho komůrce. V dalším kroku byly nasazeny v koncentraci $0,025 \times 10^6$ /ml spolu s $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml a rozpustnou mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml.

5.6.4. Proliferační testy na ověření role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů

Pro testování hypotézy, že za přítomnosti makrofágů Treg tlumí lépe, byl zaveden nový model. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml v něm byly stimulovány rozpustnou mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml a rozpustnou mAb anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 μ g/ml. Tyto dvě rozpustné protilátky však samotné efektorové lymfocyty nestimulovaly. K proliferaci efektorových buněk byly do modelu přidány ještě makrofágy, a to v koncentraci $0,025 \times 10^6$ /ml. K některým jamkám byly také přidány Treg nebo

kontrolní CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v koncentraci 0,5 x 10⁶/ml. Buňky byly nasazeny do 96 jamkové mikrokultivační destičky (Nunc) v celkovém objemu 200 µl na jamku.

5.7. Sledování produkce IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk

5.7.1. Kultivace buněk pro stanovení produkce IL-2 pomocí ELISA-testu

Do 96 jamkové mikrokultivační destičky (Nunc) byly CD4⁺CD25⁻ lymfocyty nasazeny v koncentraci 0,5 x 10⁶/ml v kompletním 10 % RPMI 1640 médiu. V některých jamkách byly CD4⁺CD25⁻ lymfocyty kultivovány bez aktivace pouze v médiu. V jiných byly aktivovány různými způsoby (popsány níže) a byly k nim přidány Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty jako kontrola z koncentrace 0,5 x 10⁶/ml. Způsoby aktivace se lišily přítomností či nepřítomností makrofágů. Výsledný objem v jamce činil 200 µl.

V prvním základním způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 protilátky (klon KT-3) v koncentraci 1 µg/ml a makrofágů v koncentraci 0,025 x 10⁶/ml l.

V druhém způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky stimulovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 µg/ml a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 µg/ml vázanými na mikrokultivační 96 jamkovou destičku (Nunc). Protilátky byly naředěny do požadované koncentrace v PBS, rozpipetovány po 50 µl na jamku a destička byla inkubována v inkubátoru. Po 60 minutách byly protilátky pečlivě odsáty a do destičky nasazeny CD4⁺CD25⁻ buňky.

V třetím způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 µg/ml a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 µg/ml také vázanými na mikrokultivační 96 jamkovou destičku (Nunc). Postup navázání protilátek na destičku byl stejný. Oproti minulému způsobu však byly přidány ještě makrofágy v koncentraci 0,025 x 10⁶/ml.

Při čtvrtém způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky nasazeny v koncentraci 0,5 x 10⁶/ml a aktivovány pomocí rozpustných mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 µg/ml a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 µg/ml a makrofágů v koncentraci 0,025 x 10⁶/ml. Buňky byly nasazeny do mikrokultivační 96 jamkové destičky (Nunc).

Buňky byly kultivovány v inkubátoru po dobu 48 hodin, z každé jamky byl odebrán supernatant a zmrazen při -20° C.

5.7.2. Stanovení produkce IL-2 pomocí ELISA-testu

Na stanovení koncentrace IL-2 v supernatantu byla použita metoda sendvičová ELISA. Byla použita dvojice mAb protilátek, primární a sekundární detekční protilátka proti IL-2 (PharMingen, San Diego, CA). Na kvantifikaci reakce byl použit cytokinový standard (Genzyme, Boston, MA). Primární protilátka je navázána na povrch jamky, jsou přidány supernatanty a po inkubaci je přidána sekundární protilátka konjugovaná s enzymem peroxidázou. V dalším kroku je přidán chromogenní substrát, který enzym přemění na barevný produkt reakce a optická denzita daného zbarvení je změřena na spektrofotometru.

Do 96 jamkových mikrokultivačních destiček s vysokoabsorpčním povrchem (Costar, Cambridge, MA) bylo pipetováno 50 µl na jamku primární monoklonální protilátky proti IL-2 v koncentraci 2 µg/ml. Destička byla inkubovaná přes noc při 4°C a druhý den 2 x promyta roztokem PBS/Tween, aby se odmyla nenavázaná protilátka. Jamky byly zablokovány 200 µl roztoku PBS s 10 % FCS po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. V dalším kroku byla destička opět 2 x promyta roztokem PBS/Tween a dále byly rozpipetovány cytokinové standardy a vzorky, vždy ve dvojici. Destička byla inkubovaná přes noc při 4°C.

Další den byly jamky 4 x promyty roztokem PBS/Tween a do každé jamky bylo rozpipetováno 100 µl sekundární protilátky proti IL-2 konjugované s biotinem v koncentraci 2 µg/ml připravené v roztoku PBS s 10 % FCS. Následovala inkubace 45 minut při laboratorní teplotě a 6 x promytí roztokem PBS/Tween. Bylo přidáno 100 µl avidinperoxidasy (Sigma) o koncentraci 25 µg/ml na jamku připravené v roztoku PBS s 10 % FCS a destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Destička byla dále promyta 8 x roztokem PBS/Tween a bylo přidáno 100 µl substrátu (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), ABTS, Sigma) a 14 µl 30 % H₂O₂ (Sigma) do 10 ml ABTS substrátu. Substrát byl přeměněn enzymem na barevný produkt a barevné zbarvení bylo změřeno po 5 až 10 minutách spektrofotometrem (ELISA Reader, MR 700, Dynatech).

5.8. Stanovení exprese genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk metodou q-PCR

5.8.1. Kultivace buněk pro q-PCR

CD4⁺CD25⁻ lymfocyty byly nasazeny do 48 jamkové destičky (Costar) v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml v kompletním RPMI 1640 médiu. V některých jamkách byly CD4⁺CD25⁻ lymfocyty kultivovány bez aktivace pouze v médiu. V jiných byly aktivovány různými způsoby (popsáno níže) a byly k nim přidány Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml. Způsoby aktivace se lišily přítomností či nepřítomností makrofágů. Výsledný objem v jamce činil 1000 μ l.

Při prvním základním způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí rozpustné mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml a makrofágů v koncentraci $0,025 \times 10^6$ /ml.

U druhého způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 μ g/ml vázanými na 48 jamkovou destičku (Costar). Protilátky byly naředěny do požadované koncentrace v PBS, rozpipetovány po 100 μ l na jamku a destička byla inkubována hodinu v inkubátoru. Protilátky byly pečlivě odsáty a do destičky nasazeny CD4⁺CD25⁻ buňky.

U třetího způsobu aktivace byly CD4⁺CD25⁻ buňky aktivovány pomocí mAb anti-CD3 (klon KT-3) v koncentraci 1 μ g/ml a anti-CD28 (klon 37.51, BioLegend) v koncentraci 2 μ g/ml také vázanými na 48 jamkovou destičku (Costar). Postup navázání protilátek na destičku byl stejný. Oproti minulému způsobu však byly přidány ještě makrofágy v koncentraci $0,025 \times 10^6$ /ml.

Po 20 hodinách byly buňky odsáty a stočeny (8 minut, 300g), supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 500 μ l TRIzolu (Molecular Research Centre, Inc., Cincinnati, OH). Do každé mikrozkušavky byly dále přidány 4 μ l polyakrylového síťovadla (Molecular Research Centre). Mikrozkušavky byly okamžitě zmrazeny při -70° C.

5.8.2. Izolace RNA

K 500 μ l buněčného lyzátu v TRIzolu (Molecular Research Centre) bylo přidáno 100 μ l chloroformu (Penta, Praha, ČR) pro vysrážení RNA. Směs byla třepáním řádně promíchána, při laboratorní teplotě nechána 5-10 minut odstát a stočena (15 minut, 12000g, 4° C). Ve zkumavce vznikly dvě fáze, vrchní vodní

byla odpipetovaná do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 250 µl isopropanolu (Penta). Zkušavky byly promíchány a centrifugovány (10 minut, 12000g, 4° C). Po centrifugaci byl odsát všechn supernatant a k peletkám bylo přidáno 190 µl 75 % etanolu (Penta). Mikrozkušavky byly znovu stočeny (5 minut, 1610g). Supernatant byl odstraněn a vzorky byly resuspendovány v 12 µl PCR vody (Top-Bio, Praha, ČR).

Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE). Kvalita RNA byla také ověřena na agarosovém 1 % gelu elektroforézou, kde byla RNA vizualizována interkalací etidumbromidu pod UV světlem.

5.8.3. Reverzní transkripce

Dalším krokem byla reverzní transkripce, přepsání získané RNA do cDNA. Do reakce byl použit 1 µg RNA z každého vzorku. Nejdříve však byla RNA zbavena DNA kontaminace. RNA odpovídající 1 µg byla doplněna do objemu 8 µl PCR vodou (Top-Bio) a do každého vzorku bylo přidáno 2 µl směsi, připravené z 1 µl DNase I Reaction Buffer (Promega, Madison, WI) a z 1 µl DNase I, 1 U/µl (Promega). Konečný objem vzorku byl 10 µl. DNasová reakce byla provedena na PCR přístroji (MJ research, Warrington, MA) při 37° C po dobu 30 minut.

Okamžitě po skončení programu bylo do každého vzorku přidáno 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (Promega) pro inaktivaci DNasy I a byl zvolen program 10 minut při 65° C. Vzorky byly po skončení programu zchlazeny na ledu.

Do každého vzorku bylo poté přidáno 14 µl mixu, připraveného z 5 µl M-MLV 5 x Reaction Buffer (Promega), 2,5 µl dNTP (Promega), 1 µl Random primerů (100 ng) (Promega), 0,5 µl Ribonuclease Inhibitor (20 U) (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan), 0,5 µl Reverzní Transkriptázy M-MLV (TaKaRa Bio Inc.) a 4,5 µl PCR vody (Top-bio). Celkový objem vzorku činil 25 µl. Přepis byl proveden na PCR přístroji (MJ research) při 37° C po dobu 60 minut. Každý vzorek cDNA byl naředěn 100 µl PCR vody (Top-Bio).

5.8.4. q-PCR

Získaná cDNA byla amplifikována metodou q-PCR. Byly použity primery pro GAP (referenční house-keepingový gen), sense (5'-AGA ACA TCA TCC CTG CAT CC-3') a antisense (5'-ACA TTG GGG GTA GGA ACA C-3') a primery pro

IL-2 sense (5'-TTC AAT TCT GTG GCC TGC TT-3') a antisense (5'-GCT GTT GAT GGA CCT ACA GGA-3'), (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR).

Do 96 jamkové PCR destičky (Bio-Rad, Hercules, CA) bylo rozpipetováno 12 μ l směsi na jamku. Směs byla složena z 7,5 μ l iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,4 μ l primeru sense, 0,4 μ l primeru antisense a z 3,7 μ l PCR vody (Top-Bio). Vzorky byly do destičky nanесeny v objemu 3 μ l na jamku po dvojicích pro každý gen. Reakce byla provedena na PCR přístroji (iCycler Optical Module, BioRad). Specifita získaných produktů byla kontrolována analýzou křivek tání. K vypočítání exprese genu byl použit relativní model kvantifikace v porovnání s GAP. PCR parametry pro 15 μ l reakci zahrnují v prvním kroku 3 minuty při 95° C - aktivace "Hot start" polymerázy, v každém cyklu potom 10 sekund při 95° C - denaturace cDNA, 20 sekund při 60° C nasedání primerů, 20 sekund při 72° C fázi elongace a 5 sekund při 82° C fázi načítání fluorescence. V třetím kroku na konci reakce proběhne analýza křivek tání zvyšováním teploty o 0,5 °C každých 10 sekund, z 55° C až na 95° C.

5.9. Stanovení apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou Live cell imaging

Makrofágy, získané opakovaným výplachem peritonea, byly kultivované v 8 jamkové Lab-Tek (Nunc) komůrce v koncentraci $0,25 \times 10^6$ /ml v kompletním RPMI 1640 médiu. Po 6 hodinách byly neadherentní buňky odmyty a do komůrek s adherovanými makrofágy byly nasazeny Treg a CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v poměru 2:1 k makrofágům. Buňky byly kultivovány 14 hodin v klimatickém boxu pod inverzním mikroskopem Leica DMI6000 s TITF iluminací (Leica Microsystems, Wetzlar, DE). Každých 10 minut byl zachycen snímek při zvětšení 40 x 0,55. Snímky byly zpracovány v softwaru LAS AF (Leica).

5.10. Statistická analýza

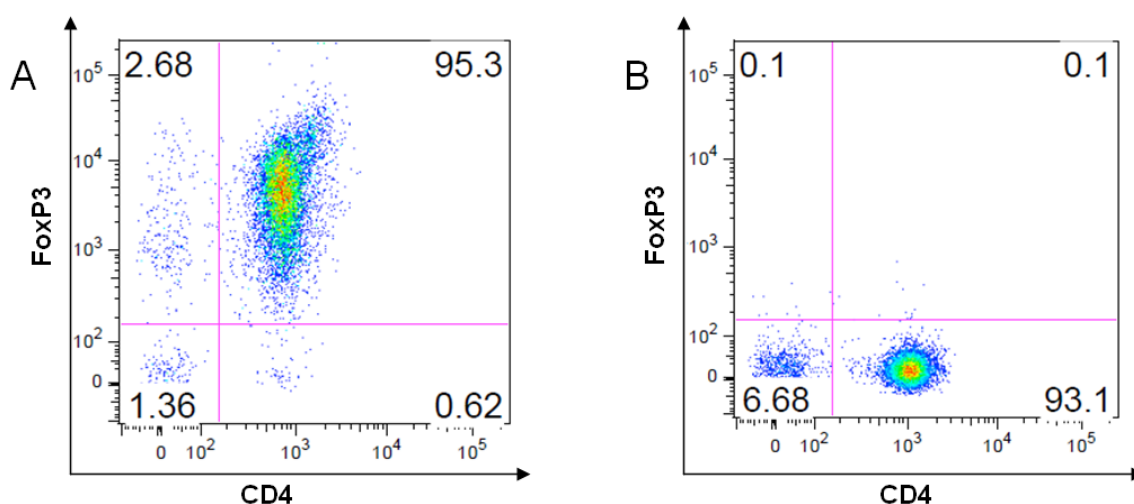
Výsledky jsou průměrem ze tří nebo čtyř pokusů \pm SD. Statistická signifikance rozdílu mezi danými hodnotami byla počítána pomocí Studentova t-testu.

6. Výsledky

6.1. Fenotypová charakterizace Treg a $CD4^+CD25^-$ lymfocytů

Treg (tj. $CD4^+CD25^+$ T lymfocyty) a $CD4^+CD25^-$ T lymfocyty byly získány z homogenátu čerstvé sleziny dvoukrokovou magnetickou separací. Získané buněčné frakce byly analyzovány průtokovou cytometrií. Buňky byly označeny mAb anti-CD4, permeabilizovány a mAb byl označen transkripční faktor FoxP3. Bylo zjištěno, že populace Treg obsahuje více než 95 % FoxP3⁺ buněk (Obr. 1). Populace $CD4^+CD25^-$ lymfocytů obsahovala více než 93 % $CD4^+FoxP3^-$ buněk a podíl FoxP3⁺ buněk byl u této populace méně než 0,2 %. Negativní $CD4^+CD25^-$ lymfocytární frakce byla použita jako konvenční $CD4^+$ T lymfocyty.

Získané populace byly pravidelně kontrolovány průtokovou cytometrií a bylo dosahováno čistoty srovnatelné s ukázaným typickým pokusem.



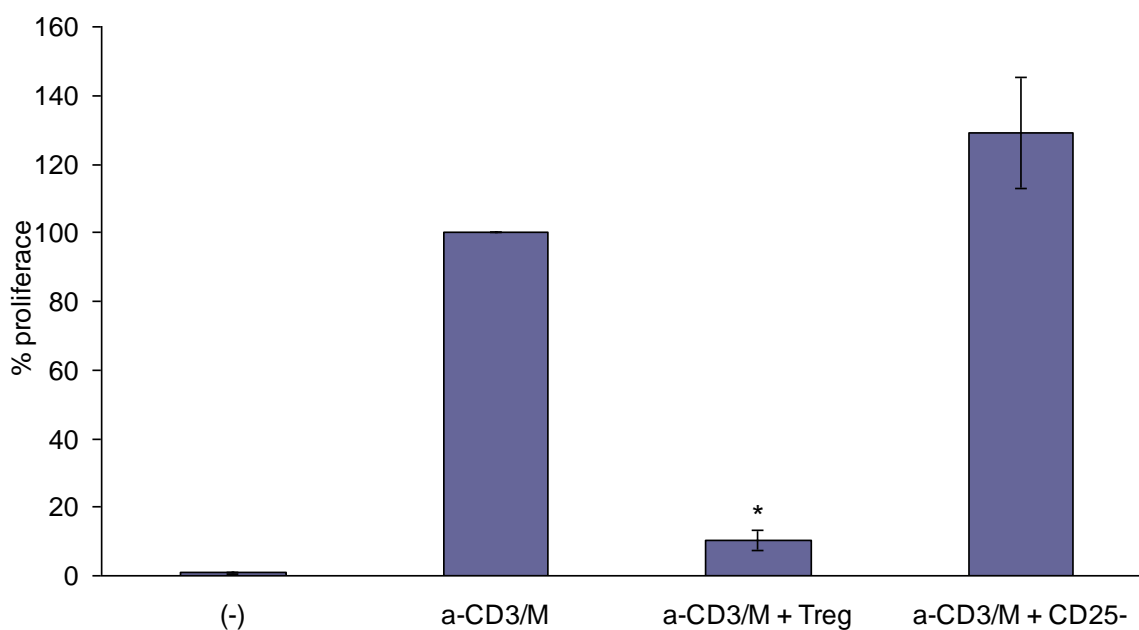
Obr. 1: Charakterizace Treg a $CD4^+CD25^-$ lymfocytů získaných magnetickou separací. Z homogenizované sleziny byly dvoukrokovou magnetickou separací získány Treg a $CD4^+CD25^-$ T lymfocyty. Čistota získaných frakcí byla ověřena průtokovou cytometrií. Frakce $CD4^+CD25^+$ T lymfocytů obsahuje více než 95 % FoxP3⁺ (A). Frakce $CD4^+CD25^-$ lymfocytů obsahuje přes 93 % FoxP3⁻ (B). Na obrázku jsou ukázány výsledky jednoho typického pokusu ze čtyř podobných.

6.2. Průkaz supresorové funkce Treg

Magnetickou separací byla získána frakce Treg lymfocytů. Pro ověření jejich supresorových schopností byly tyto buňky přidány k stimulovaným efektorovým $CD4^+CD25^-$ lymfocytům, kde by měly tlumit jejich proliferaci. Použitý způsob stimulace efektorových buněk je užit i v mnoha jiných pokusech této diplomové práce. Je označován jako základní proliferační model.

Purifikované $CD4^+CD25^-$ buňky byly kultivovány samotné nebo byly stimulované mAb anti-CD3 v přítomnosti makrofágů. Protilátka anti-CD3 aktivuje koreceptor TCR a spustí signální kaskádu vedoucí k aktivaci T buňky. K účinné aktivaci T buňky je nutný kostimulační signál přes molekulu CD28, v tomto modelu poskytovaný makrofágy a jejich molekulami CD80/CD86.

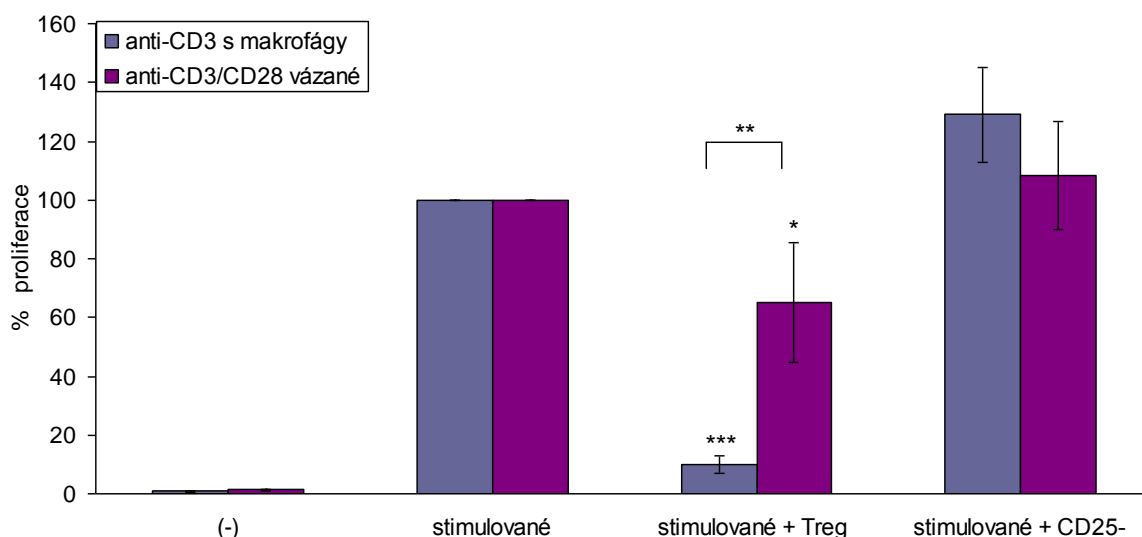
Ke stimulovaným buňkám byly přidány Treg a $CD4^+CD25^-$ T lymfocyty jako kontrola v poměru 1:1. Na obrázku 2 je ukázáno, že Treg tlumí proliferaci efektorových $CD4^+CD25^-$ buněk o více než 90 %. Přidání kontrolních $CD4^+CD25^-$ lymfocytů proliferaci ještě zvyšuje.



Obr. 2: Průkaz supresorové aktivity Treg. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 a makrofágy (a-CD3/M). K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze čtyř nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje statisticky významnou ($p < 0,0005$) supresi.

6.3. Role makrofágů při supresi proliferace efektorových T lymfocytů

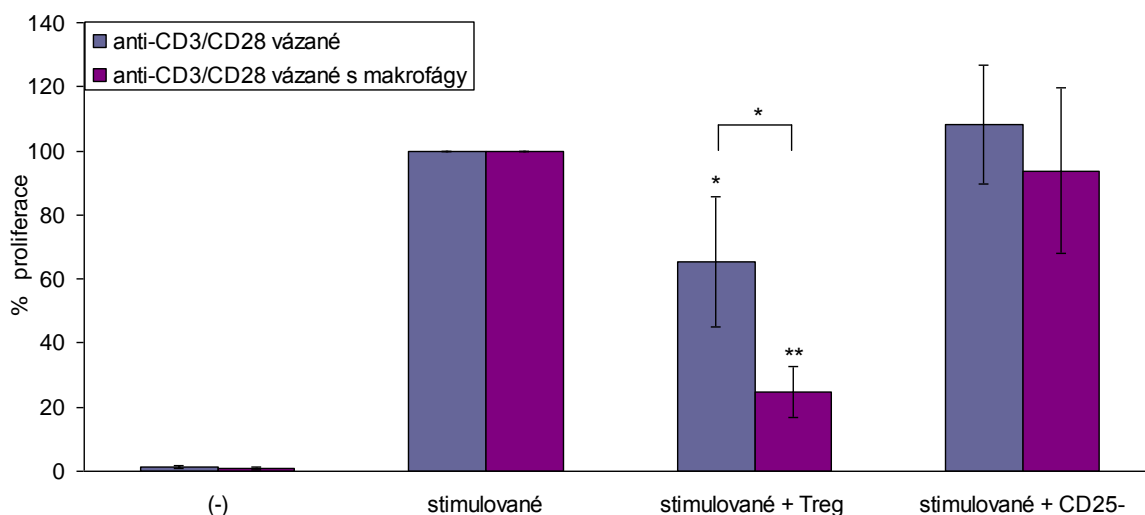
Po průkazu supresorových schopností Treg v modelu aktivace efektorových buněk pomocí mAb anti-CD3 a makrofágů byly jejich tlumivé vlastnosti testovány v jiných modelech aktivace efektorových T lymfocytů. Byly porovnány dva modely, v prvním byly $CD4^+CD25^-$ T lymfocyty aktivovány základním způsobem pomocí mAb anti-CD3 a makrofágy. V druhém modelu byly T lymfocyty stimulovány mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. Protilátka anti-CD28 slouží v tomto modelu jako druhý signál pro T lymfocyty. Obě protilátky jsou vázané, protože navázání protilátek na pevný povrch způsobí efektivnější stimulaci efektorových T lymfocytů. Při stimulaci efektorových buněk mAb anti-CD3 a makrofágy Treg tlumily proliferaci velmi efektivně, o více než 90 %. Při druhém způsobu aktivace mAb anti-CD3 a anti-CD28 Treg také signifikantně tlumily proliferaci efektorových buněk, avšak podstatně méně, přibližně o 40 % (Obr. 3).



Obr. 3: Role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 s makrofágy nebo mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje hladinu signifikance $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Na základě těchto výsledků bylo dále testováno, zda je supresorová schopnost Treg ovlivněna přítomností makrofágů v prvním modelu a zda k účinné supresi proliferace Treg využívají makrofágy. Byly použity dva modely, kde v obou

byly $CD4^+CD25^-$ efektorové lymfocyty stimulovány mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. V jednom z proliferačních modelů byly navíc přidány makrofágy. Bylo pozorováno, že v přítomnosti makrofágů byla suprese proliferace významně vyšší (Obr. 4).



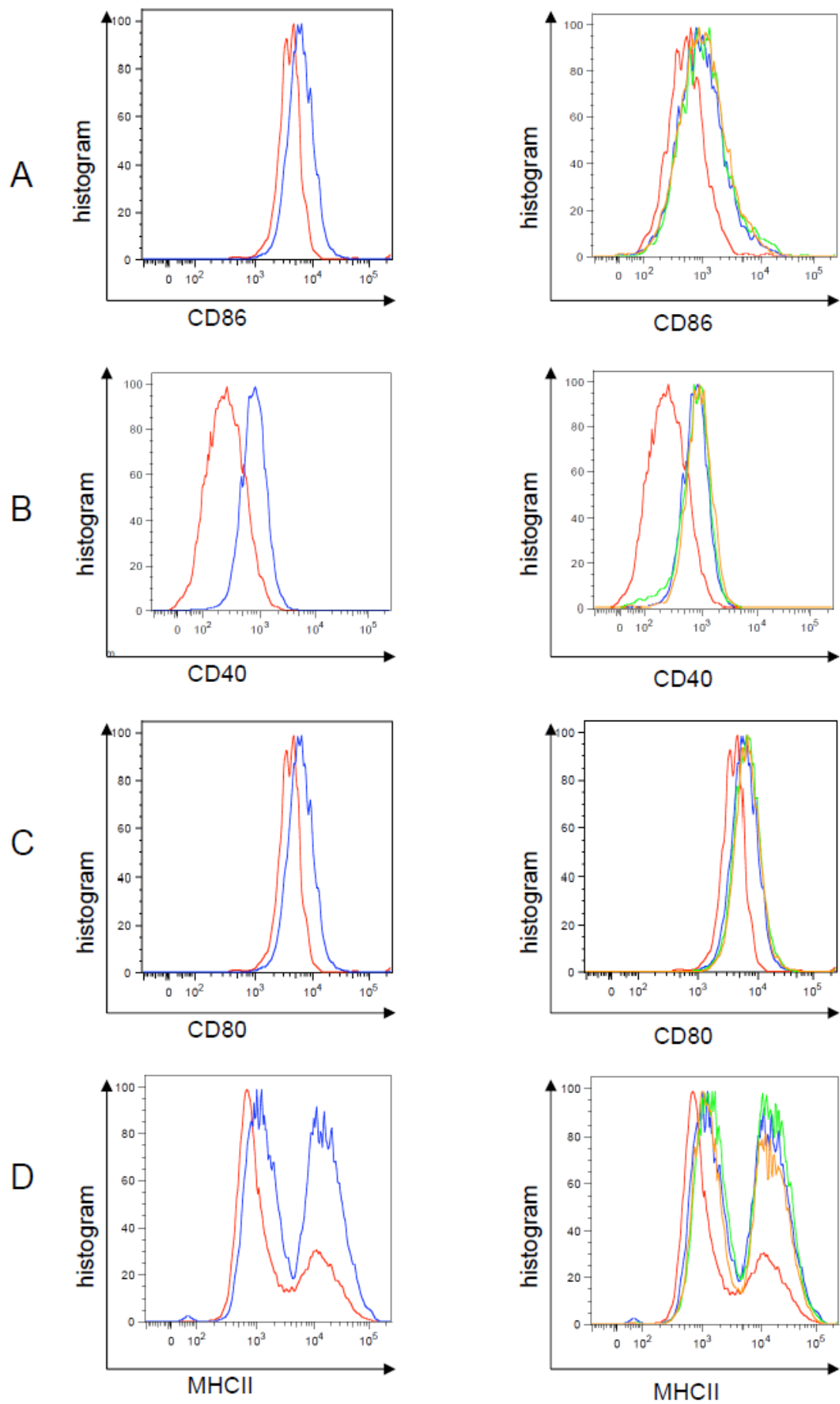
Obr. 4: Role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-) nebo stimulované mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku bez a v přítomnosti makrofágů. K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje hladinu signifikance $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$.

Pokud jsou v modelu přítomné makrofágy, Treg vykazují větší supresorovou schopnost. To by mohlo znamenat, že Treg nějakým způsobem působí na makrofágy a zmenšují jejich schopnosti poskytovat T lymfocytům druhý signál. Treg by mohly snižovat expresi kostimulačních molekul, snižovat expresi MHCII molekul důležitých pro prezentaci antigenu nebo způsobovat buněčnou smrt makrofágů.

6.4. Exprese kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII molekul u makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg

Dále byla testována možnost, že Treg působí snížení exprese kostimulačních CD80, CD86 nebo CD40 molekul a MHCII molekul. Nejprve byla charakterizována exprese molekul CD80, CD86, CD40 a MHCII u makrofágů neaktivovaných a aktivovaných LPS po dobu 24 hodin. K některým makrofágům byly od začátku aktivace přidány Treg nebo CD4⁺CD25⁻ T lymfocyty jako kontrola v poměru 1:1.

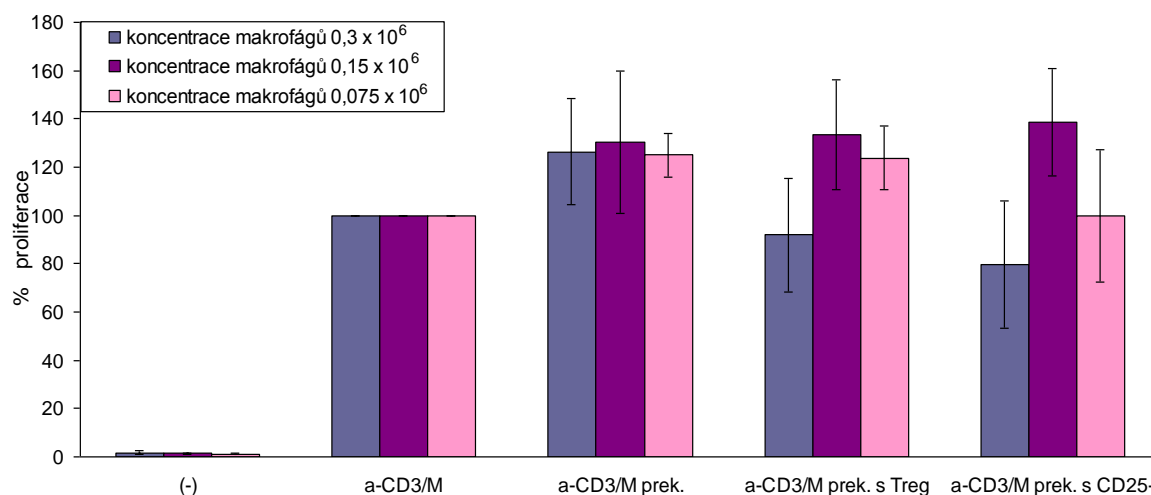
Makrofágy po aktivaci zvyšují expresi všech vybraných molekul (Obr. 5). Exprese CD40 a MHCII se zvyšuje významněji, exprese CD80 a CD86 méně významně. U MHCII je vidět velký nárůst počtu buněk, které jsou MHCII pozitivní. Dále bylo zjištěno, že makrofágy aktivované a kultivované s Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocyty se v míře exprese žádné z molekul výrazně neliší od aktivovaných makrofágů inkubovaných v nepřítomnosti těchto lymfocytů. Výsledky tak ukazují, že v našem modelu Treg výrazně neovlivňují expresi kostimulačních molekul ani MHCII molekul na makrofázích po stimulaci LPS.



Obr. 5: Exprese kostimulačních CD80, CD86 nebo CD40 molekul a MHCII molekul u makrofágů po aktivaci a jejich změna při kultivaci s Treg. Makrofágy byly kultivovány samotné, aktivované LPS a aktivované LPS s Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v poměru 1:1 k makrofágům po dobu 24 hodin. Na obrázku jsou zobrazeny tyto molekuly: CD86 (**A**), CD40 (**B**), CD80 (**C**) a MHCII (**D**). Červená linie u všech obrázku ukazuje expresi molekul u neaktivovaných makrofágů. Modrá linie ukazuje expresi molekul po aktivaci makrofágů LPS. Oranžová linie označuje kultivaci aktivovaných makrofágů s Treg. Zelená linie označuje kultivaci aktivovaných makrofágů s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty. Na obrázku jsou výsledky jednoho typického pokusu ze tří nezávislých stanovení.

6.5. Testování kostimulačních vlastností makrofágů po inkubaci s Treg

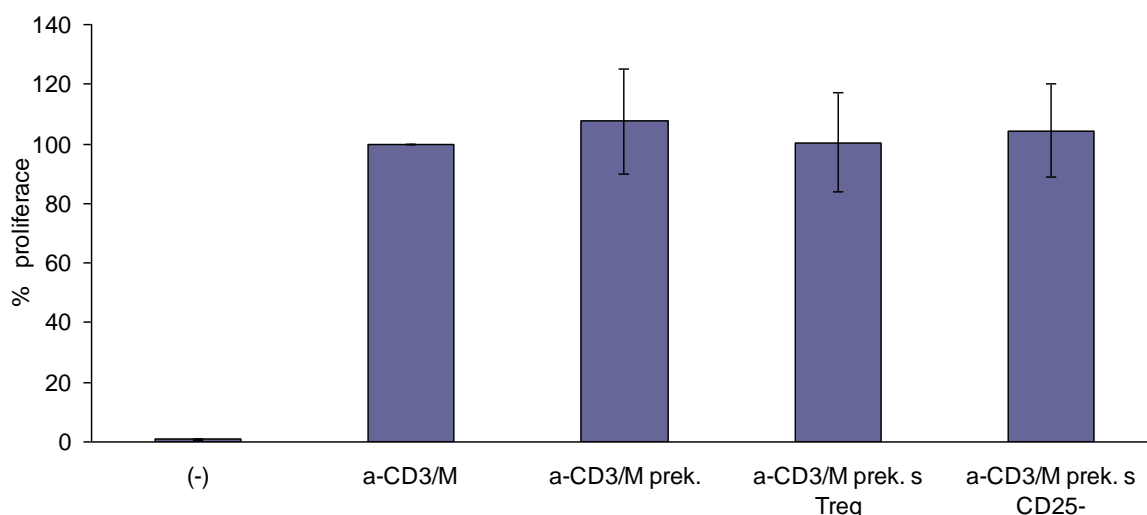
Analýza exprese kostimulačních a MHCII molekul po aktivaci makrofágů ukázala, že přítomnost Treg ani CD4⁺CD25⁻ lymfocytů významně neovlivňuje jejich expresi. Toto pozorování bylo ověřeno funkčními testy. Makrofágy byly kultivovány ve třech koncentracích (0,3; 0,15 a 0,075 x 10⁶/ml) samotné, s Treg nebo s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty. Treg i CD4⁺CD25⁻ T lymfocyty byly přidány vždy ve stejné koncentraci, 0,3 x 10⁶/ml. Jejich poměr k makrofágům se s klesající koncentrací makrofágů zvyšoval (1:1, 2:1, 4:1). Po 24 hodinách byly neadherované buňky odmyty a k adherentním buňkám, makrofágům, byly přidány CD4⁺CD25⁻ efektorové lymfocyty a mAb anti-CD3. Efektorové lymfocyty byly také kultivovány s mAb anti-CD3 a čerstvě odebranými makrofágy jako kontrolou. Byly porovnány proliferace efektorových buněk stimulovaných anti-CD3 a čerstvými nebo různě prekultivovanými makrofágy. Mezi proliferacemi s makrofágy čerstvými, prekultivovanými, prekultivovanými v přítomnosti Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocytů nebyl signifikantní rozdíl. Prekultivace makrofágů s Treg ani s CD4⁺CD25⁻ tedy neovlivnila významně jejich kostimulační schopnosti (Obr. 6).



Obr. 6: Proliferační testy na ověření kostimulačních vlastností makrofágů. Makrofágy byly prekulivovány samotné (prek.), s Treg nebo s CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v poměru 1:1. Po 24 hodinách byly neadherované buňky odmyty a k adherentním makrofágům byly přidány efektorové CD4⁺CD25⁻ buňky, které byly aktivovány rozpustnou mAb anti-CD3 a již adherovanými makrofágy (a-CD3/M prek.). Jako kontrola byly použity CD4⁺CD25⁻ lymfocyty samotné (-) a čerstvé makrofágy místo prekulivovaných (a-CD3/M). Výsledky jsou průměrem ± SD ze tří nezávislých pokusů

Výsledky ukázaly, že Treg významně neovlivňují kostimulační vlastnosti makrofágů. Toto pozorování bylo dále ověřeno následujícím pokusem.

Makrofágy byly kultivovány s Treg nebo s CD4⁺CD25⁻ v poměru 1:1 na Petriho misce. Po 24 hodinové inkubaci byly neadherentní buňky odmyty, makrofágy uvolněny, centrifugovány a spočítány. Takto získané makrofágy byly přidány v poměru 1:20 k CD4⁺CD25⁻ efektorovým lymfocytům stimulovaným mAb anti-CD3. Mezi proliferacemi s makrofágy čerstvými, prekulivovanými, prekulivovanými v přítomnosti Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocytů nebyl signifikantní rozdíl (Obr. 7). Výsledky tak potvrzují pozorování z prvního pokusu.



Obr. 7: Proliferační testy na ověření kostimulačních vlastností makrofágů. Makrofágy byly prekultivovány samotné (prek.), s Treg nebo s $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Po 24 hodinách byly makrofágy uvolněny, spočítány a přidány k $CD4^+CD25^-$ lymfocytům stimulovaným rozpustnou mAb anti-CD3 (a-CD3/M). Jako kontrola byly použity $CD4^+CD25^-$ lymfocyty samotné (-) a čerstvé makrofágy místo prekultivovaných (a-CD3/M). Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů.

6.6. Stanovení apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg

6.6.1. Detekce apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou průtokové cytometrie

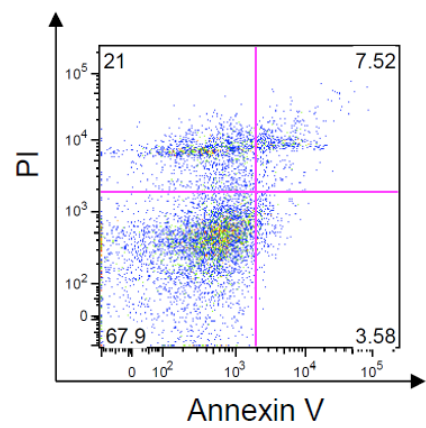
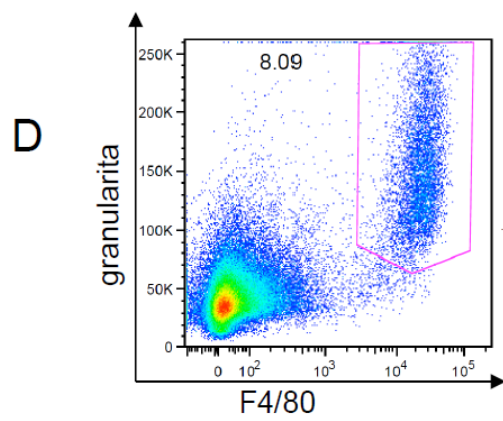
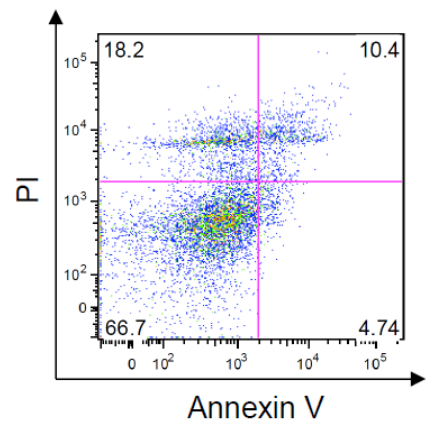
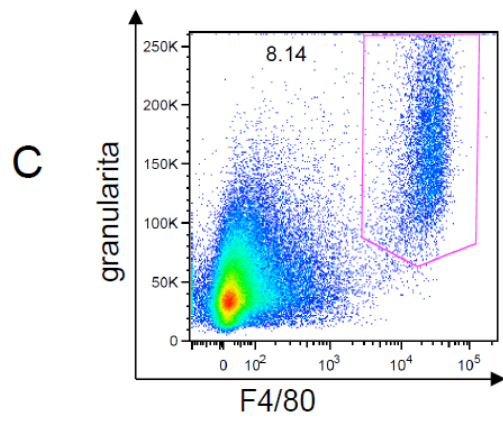
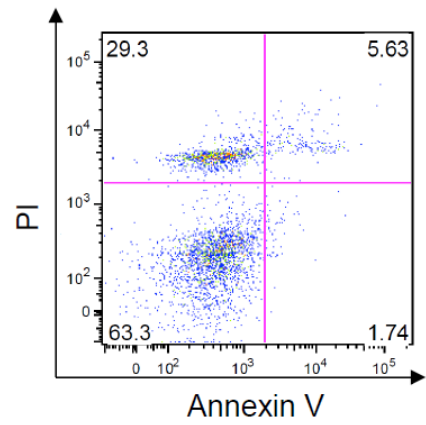
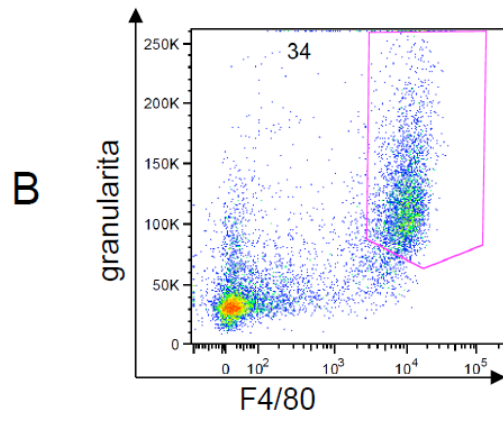
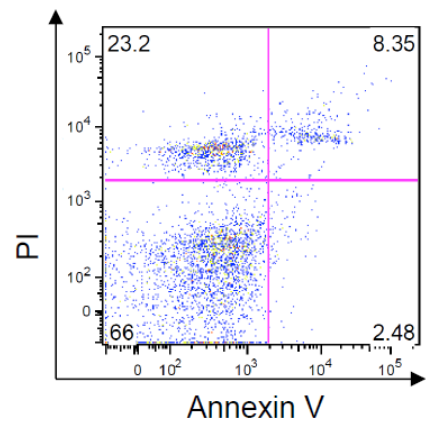
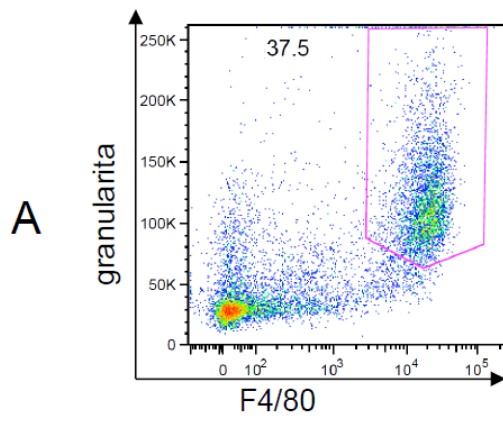
Další teorie, která by mohla vysvětlit, proč za přítomnosti makrofágů Treg tlumí proliferaci efektorových lymfocytů více, byla teorie apoptotické smrti. Cílem bylo ověřit, zda vyšší supresorová schopnost Treg v modelu s makrofágy není způsobena apoptotickou smrtí makrofágů působením Treg.

Makrofágy byly kultivovány samotné, aktivované LPS, a aktivované LPS za přítomnosti Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocytů v poměru 1:2. Po 24 hodinách byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií. Na detekci mrtvých buněk byl použit PI, interkalující se do DNA, na detekci apoptotických buněk byl použit Annexin V vázající se na PS. PS je fosfolipid za normálních podmínek přítomný na vnitřní straně membrány, jeho výskyt na vnější straně membrány je znak pro čerstvě apoptotické buňky. Makrofágy byly označeny protilátkou proti molekule F4/80, která je pro ně typický znak.

Na obrázku 8 jsou v pravém sloupci zobrazeny 4 různé populace. Buňky negativní na PI a Annexin V jsou živé buňky. Buňky negativní na PI ale pozitivní na Annexin V jsou buňky v apoptóze. Buňky pozitivní na PI i Annexin V jsou buňky

již mrtvé prošlé apoptózou. Buňky pozitivní na PI ale negativní na Annexin V jsou mrtvé buňky, u kterých buď neproběhla apoptóza nebo již jsou rozpadlé na tolik, že nemají v membráně přítomný PI.

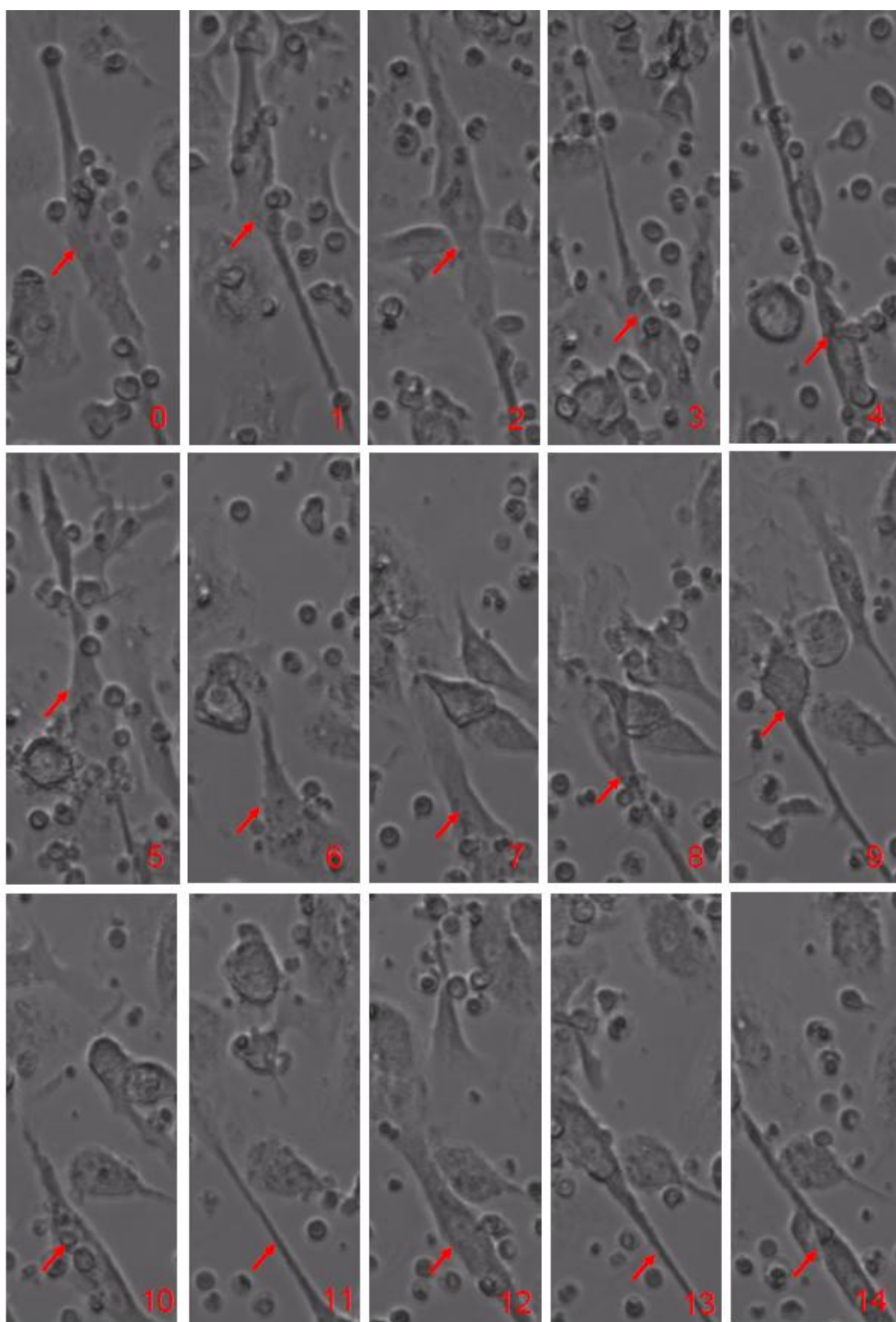
Aktivované i neaktivované makrofágy vykazovaly vysoké procento mrtvých buněk. Pokud sečteme všechny mrtvé buňky, tedy horní dvě populace, z neaktivovaných makrofágů bylo 31 % mrtvých (Obr. 8A). U aktivovaných makrofágů bylo mrtvých 34 % buněk (**B**). Makrofágy aktivované a inkubované s Treg měly menší počet mrtvých buněk, 29 % (**C**). U makrofágů aktivovaných a inkubovaných s $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byl počet mrtvých buněk stejný jako při inkubaci s Treg, 29 % (**D**). Mezi jednotlivými jamkami nebyl signifikantní rozdíl v počtu mrtvých buněk. Apoptózu se nám nepodařilo zachytit, populace apoptotických buněk byla vždy velmi malá. V přítomnosti $CD4^+CD25^-$ lymfocytů je apoptotických 2,5 % buněk, s Treg 4,7 % buněk. Počty mrtvých buněk však ukazují, že Treg v našem modelu pravděpodobně smrt makrofágů nezpůsobují.



Obr. 8: Stanovení apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg. Makrofágy byly inkubovány samotné neaktivované, aktivované LPS, a aktivované LPS za přítomnosti Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:2. Po 24 hodinách byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií. Počty buněk v jednotlivých kvadrantech jsou uvedeny pro neaktivované makrofágy **(A)**, aktivované makrofágy **(B)**, aktivované makrofágy inkubované s Treg **(C)** a aktivované makrofágy inkubované s $CD4^+CD25^-$ **(D)**. Na obrázku jsou výsledky z jednoho typického pokusu ze čtyř stanovení.

6.6.2. Sledování apoptotické smrti makrofágů po inkubaci s Treg metodou Live cell imaging

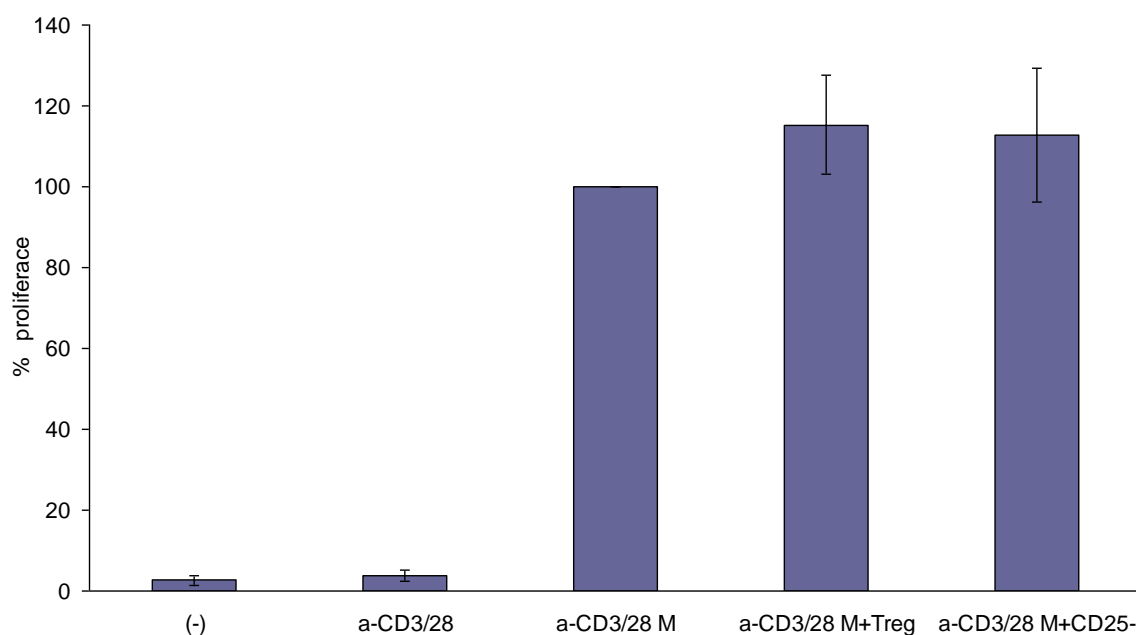
Vzhledem k tomu, že se nepovedlo zachytit apoptózu metodou průtokové cytometrie, dalším krokem bylo sledovat interakce buněk v kultuře. Pro tento účel byla použita metoda Live cell imaging, kdy byla kultura adherovaných makrofágů a Treg k nim přidaných v poměru 2:1 kultivována po 14 hodin pod mikroskopem. Každých 10 minut kamera zachytila snímek kultury. Obrázek 9 zobrazuje jeden typický makrofág v hodinových intervalech po celou dobu kultivace. Makrofág měnil svůj tvar a přemísťoval se, smršťování do kulovitého tvaru, kterým makrofágy reagují na stres, nebylo pozorováno. U určitých buněk byla pozorována interakce mezi Treg a makrofágy. Navzdory občasným interakcím mezi makrofágy a Treg nebylo zachyceno, že by makrofág po obklopení Treg začal fragmentovat membránu, nebo se rozpadat. Bylo tedy potvrzeno pozorování z předchozího pokusu, že Treg zřejmě nezpůsobují smrt makrofágů.



Obr. 9: Makrofágy a jejich 14 hodinová kultivace s Treg. K adherovaným makrofágům byly přidány Treg v poměru 1:2 a buňky byly kultivovány pod mikroskopem po 14 hodin. V pravidelných intervalech byla kultura snímána. Číslo vpravo v dolním rohu výřezů určuje hodinu záznamu, kdy byl obrázek zachycen. Na obrázku je zachycen jeden typický makrofág.

6.7. Ověření role makrofágů při supresi proliferace efektorových lymfocytů

Ovlivnění exprese kostimulačních a MHCII molekul na makrofázích Treg nebylo prokázáno. Stejně tak nebyla prokázána buněčná smrt makrofágů způsobená Treg. Dalším krokem bylo nové otestování původních modelů různých druhů stimulací efektorových buněk, lišících se přítomností nebo nepřítomností makrofágů. Byl zaveden nový model stimulace efektorových buněk. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly nasazeny samotné a stimulované rozpustnými mAb anti-CD3 a anti-CD28. Pokud byly přítomné pouze obě rozpustné protilátky, lymfocyty neproliferovaly. Po přidání makrofágů do tohoto modelu lymfocyty proliferovaly. Ke stimulovaným buňkám byly přidány Treg a $CD4^+CD25^-$ T lymfocyty jako kontrola v poměru 1:1. V tomto modelu Treg netlumily proliferaci efektorových buněk (Obr. 11).



Obr. 10: Role makrofágů při supresi proliferace indukované mAb anti-CD3 a anti-CD28. $CD4^+CD25^-$ efektorové lymfocyty byly kultivovány samotné (-) nebo byly stimulovány rozpustnými mAb anti-CD3 a anti-CD28 (a-CD3/28). Samotné protilátky však nezpůsobovaly proliferaci efektorových lymfocytů. Proliferace nastala až po přidání makrofágů (a-CD3/28 M). K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů.

Tento způsob aktivace efektorových lymfocytů nepodporuje hypotézu, že v přítomnosti makrofágů Treg tlumí více. Stejně tak neukazuje na možnost, že Treg tlumí proliferaci přes makrofágy. Dále bylo tedy testováno, zda rozdíly v supresi pozorované v různých modelech nejsou způsobeny kvantitativně nebo kvalitativně různým způsobem aktivace efektorových buněk, nikoliv samotným působením Treg na makrofágy.

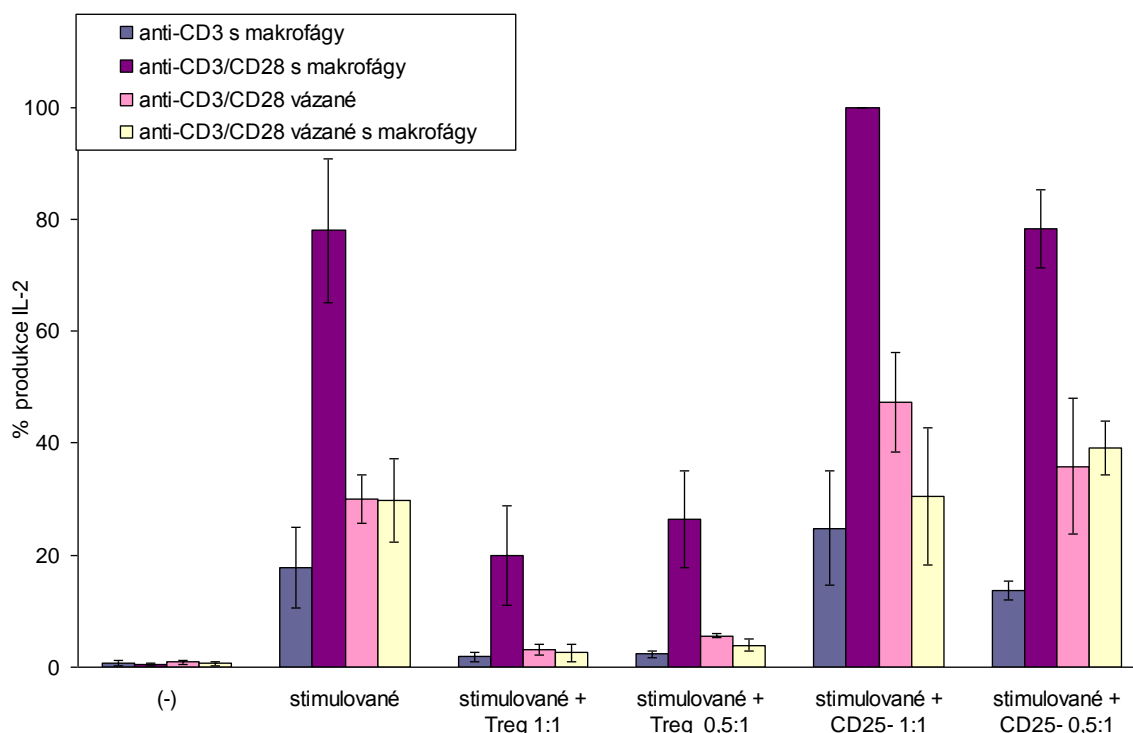
6.8. Porovnání produkce IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk

V dalším kroku bylo otestováno, zda rozdíly v supresi proliferace jsou způsobené odlišnou mírou aktivace v různých modelech. Bylo provedeno měření produkce IL-2 v jednotlivých modelech metodou ELISA. IL-2 je hlavní aktivační cytokin produkovaný T lymfocyty, který je zároveň stimuluje. Produkce IL-2 koreluje s mírou aktivace efektorových buněk.

V prvním modelu byly $CD4^+CD25^-$ efektorové lymfocyty stimulovány mAb anti-CD3 a makrofágy, v druhém modelu byly stimulovány mAb

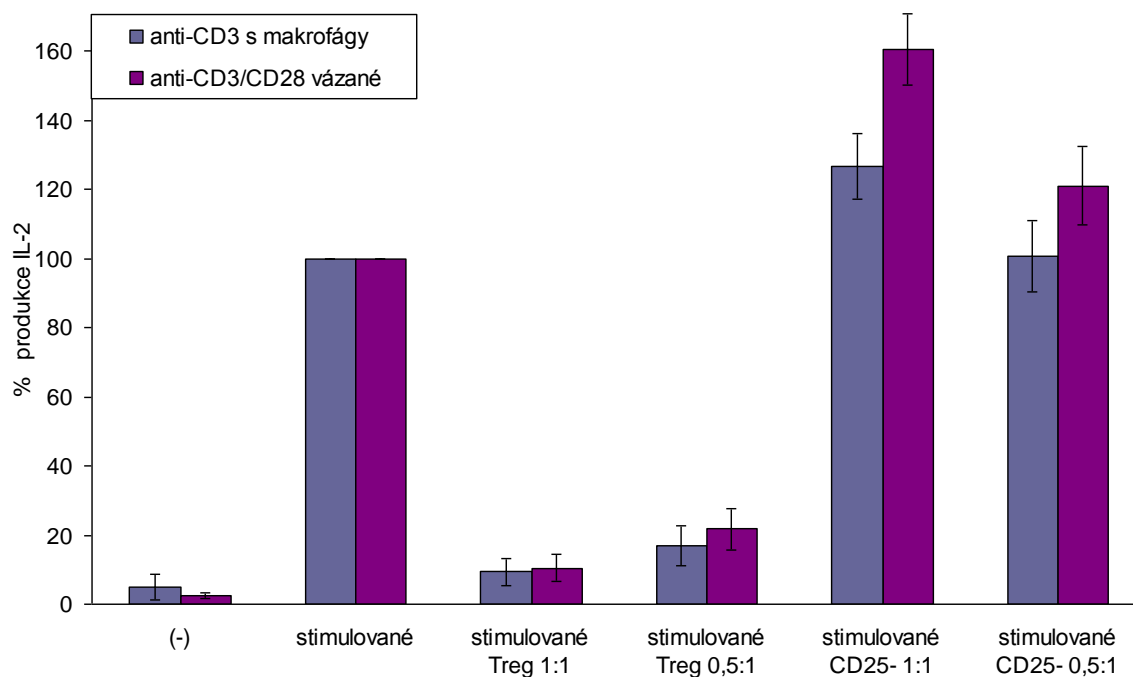
anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku a v třetím způsobu stimulace mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku a makrofágy. Jako čtvrtý model proliferace byl použit model, kde byly efektorové lymfocyty stimulovány rozpustnými mAb anti-CD3, anti-CD28 a makrofágy. Treg v tomto modelu netlumily proliferaci efektorových buněk. V ostatních modelech proliferace Treg s rozdílnou mírou tlumily. Produkce IL-2 byla zjištěna v kultuře po 48 hodinách při všech čtyřech způsobech stimulace efektorových buněk.

Nejdříve byla porovnána produkce IL-2 ve všech kulturách (Obr. 11). Nejméně IL-2 bylo v kultuře při stimulaci efektorových buněk mAb anti-CD3 s makrofágy. V tomto modelu Treg při proliferačních testech tlumí nejefektivněji. Mezi modely stimulace vázanými protilátkami, lišícími se pouze přítomností makrofágů, nebyly signifikantní rozdíly. Při čtvrtém způsobu stimulace efektorových buněk rozpustnými mAb a makrofágy bylo množství IL-2 v kultuře významně vyšší. V tomto modelu při proliferačních testech Treg netlumily. Produkce IL-2 v přítomnosti Treg byla sice snižena, ale výrazně méně než u ostatních modelů. V přítomnosti Treg bylo v kultuře stejné množství IL-2 jako v jiných modelech při nepřítomnosti Treg. Velké množství IL-2 i v přítomnosti Treg zřejmě způsobuje vysokou proliferaci efektorových buněk a Treg tedy v tomto modelu netlumí.



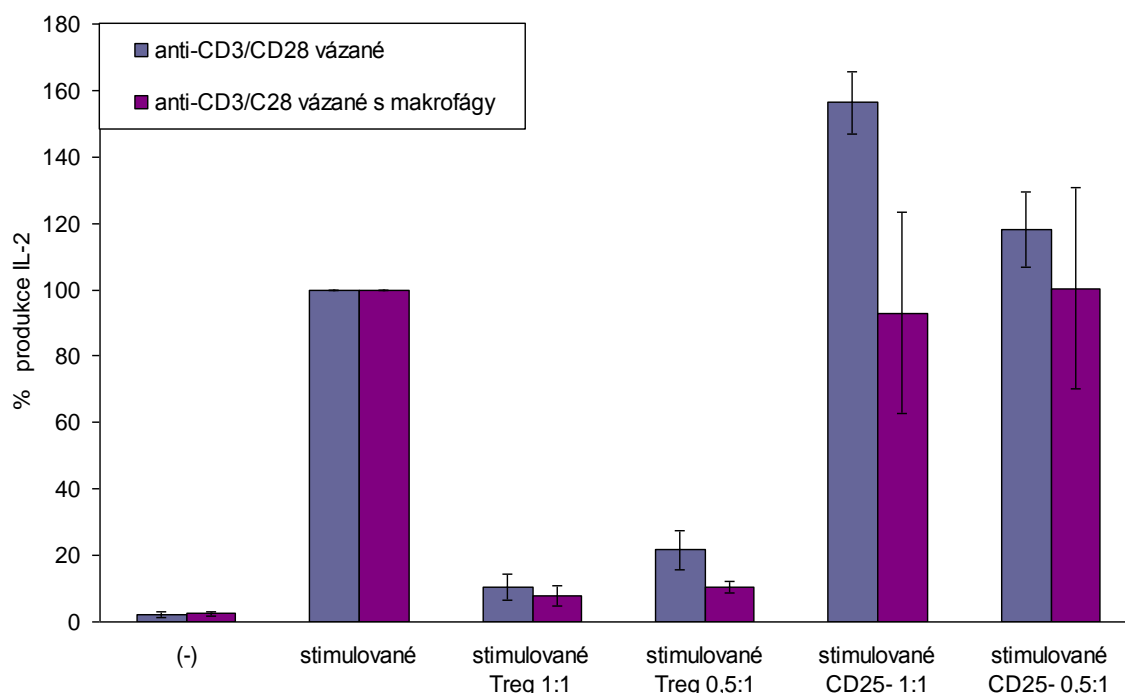
Obr. 11: Porovnání produkce IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk. CD4⁺CD25⁻ efektorové lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 a makrofágy nebo mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku nebo mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku s makrofágy nebo rozpustnými mAb anti-CD3, anti-CD28 s makrofágy. K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo CD4⁺CD25⁻ lymfocyty v poměru 1:1 nebo 0,5:1. Jako 100 % je brána nejvyšší naměřená hodnota. Výsledky jsou průměrem ± SD ze tří nezávislých pokusů.

Dále byly porovnány jednotlivé modely aktivace efektorových buněk mezi sebou, stejně jako na začátku u proliferačních pokusů. Nejdříve byly porovnány modely stimulace efektorových buněk mAb anti-CD3 s makrofágy a mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku (Obr. 12). V obou modelech je v přítomnosti Treg velmi málo IL-2, rozdíly jsou velmi malé a nejsou signifikantní.



Obr. 12: Produkce IL-2 při dvou různých způsobech stimulace efektorových buněk. $CD4^+CD25^-$ efektorové lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulovaleny mAb anti-CD3 s makrofágy nebo mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. K stimulovalým buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1 nebo 0,5:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů.

Dále byly porovnány modely stimulace efektorových lymfocytů mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku, lišícími se přítomností makrofágů. U těchto modelů byl pozorován malý nesignifikantní rozdíl v množství IL-2 za přítomnosti Treg, v modelu s makrofágy bylo IL-2 méně (Obr. 12). V obou modelech bylo ale v přítomnosti Treg velmi málo IL-2.



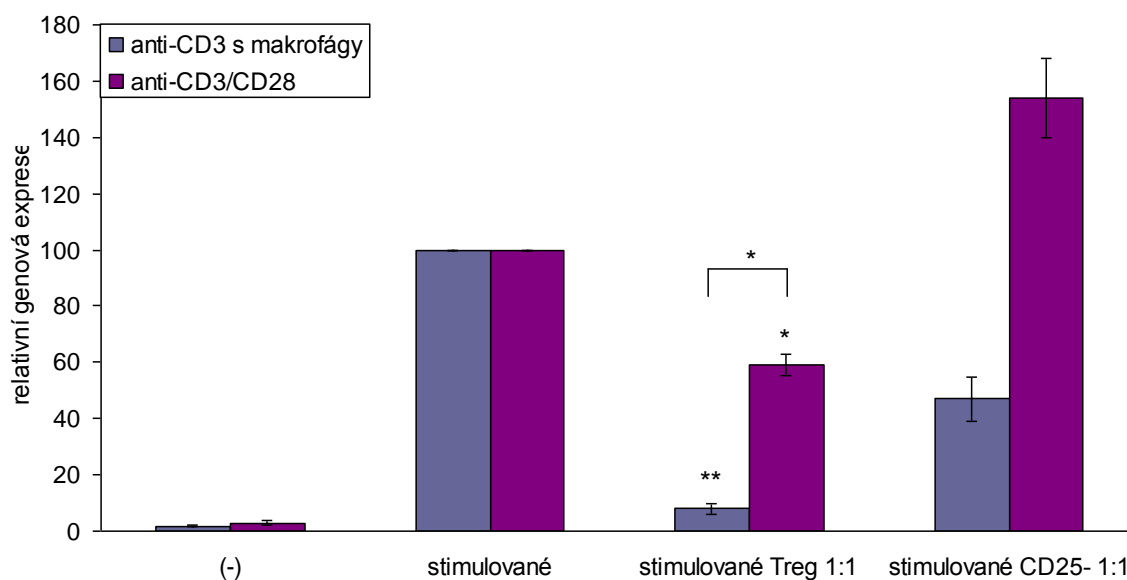
Obr. 13: Produkce IL-2 při dvou různých způsobech stimulace efektorových buněk. $CD4^+CD25^-$ efektorové lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku nebo stejnými protilátkami a makrofágy. K stimulovaným buňkám byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1 nebo 0,5:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů.

Tyto výsledky neukázaly přímou souvislost mezi produkcí IL-2 a tlumením Treg u prvních třech modelů, ale ukázaly tuto souvislost při posledním způsobu aktivace. Také v modelu stimulace efektorových buněk mAb anti-CD3 s makrofágy menší množství IL-2 v kultuře koreluje s výbornou supresorovou vlastností Treg v tomto modelu aktivace. Je možné spekulovat, že Treg netlumí proliferaci efektorových buněk stimulovaných rozpustnými protilátkami anti-CD3, anti-CD28 a makrofágy, protože tato aktivace je velmi účinná a efektorové lymfocyty vyprodukují velké množství IL-2, jehož účinky nejsou Treg schopné svými supresorovými vlastnostmi překonat. Naopak v případě stimulace mAb anti-CD3 s makrofágy je v kultuře menší množství IL-2 a Treg proto významně tlumí.

Dále bylo testováno, zda Treg tlumí přímo přepis genu pro IL-2, nebo zda vyvazují svým IL-2 receptorem již vyprodukovaný IL-2 a brání tím efektorovým lymfocytům v aktivaci a proliferaci.

6.9. Expresa genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk

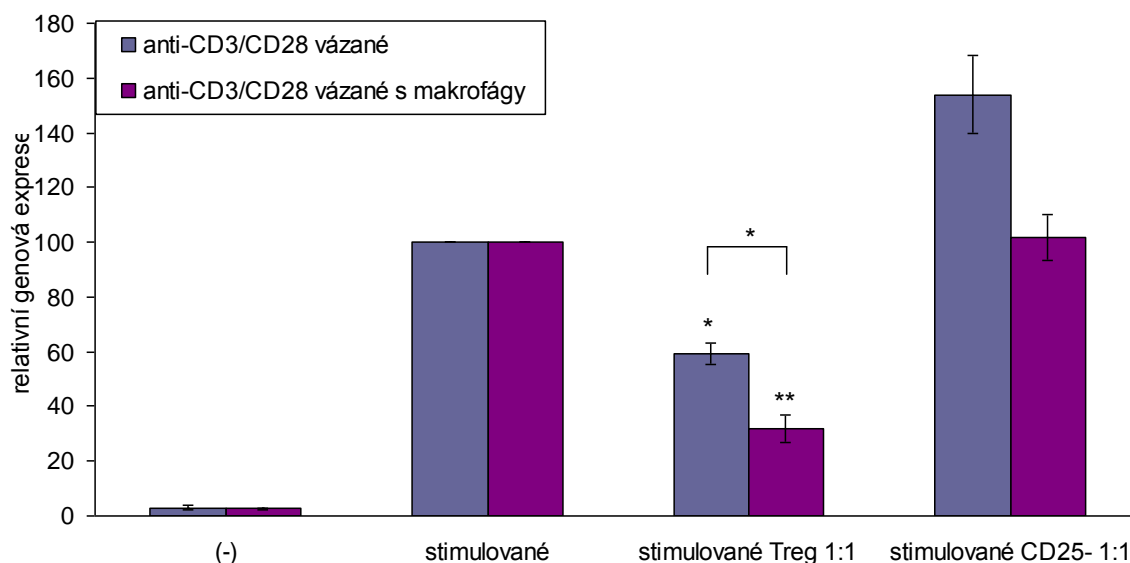
Dalším krokem bylo zjistit, zda Treg při supresi IL-2 vychytávají, nebo zda tlumí jeho produkci na genové úrovni. Efektorové $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné a stimulované třemi způsoby - mAb anti-CD3 s makrofágy, mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku a mAb anti-CD3, anti-CD28 vázanými na kultivační destičku s makrofágy. K stimulovaným efektorovým lymfocytům byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty jako kontrola, v poměru 1:1. Buňky byly analyzovány po 20 hodinách. Při stimulaci efektorových buněk mAb anti-CD3 a makrofágy Treg výrazně tlumily expresi genu pro IL-2, při stimulaci vázanými protilátkami anti-CD3 a anti-CD28 byla exprese genu pro IL-2 snížena o méně než polovinu (Obr. 14). Tyto výsledky korelují s původními proliferačními testy zaměřenými na určení role makrofágů v modelu proliferace efektorových buněk.



Obr. 14: Expresa genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk. Efektorové $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 s makrofágy nebo mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. K stimulovaným efektorovým lymfocytům byly přidány Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty jako kontrola, v poměru 1:1. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje hladinu signifikance $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$.

Dále byly porovnány další dva způsoby aktivace efektorových buněk. V prvním případě byly efektorové lymfocyty stimulovány pouze mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku. V druhém případě byly přidány ještě

makrofágy. V modelu bez makrofágů Treg tlumí expresi přibližně o 20 % méně než v modelu s makrofágy (Obr. 15).



Obr. 15: Expresí genu pro IL-2 při různých způsobech aktivace efektorových buněk. Efektorové $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-), stimulované mAb anti-CD3 a anti-CD28 vázanými na kultivační destičku nebo stimulované stejným způsobem za přítomnosti makrofágů. K stimulovaným efektorovým lymfocytům byly přidány v poměru 1:1 Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty jako kontrola. Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje hladinu signifikance $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Výsledky z q-PCR potvrdily původní výsledky, které ukazovaly větší efektivitu suprese Treg v přítomnosti makrofágů v modelu. Není to však pravděpodobně způsobeno působením Treg na makrofágy, ale odlišným způsobem aktivace, který nastane za přítomnosti makrofágů.

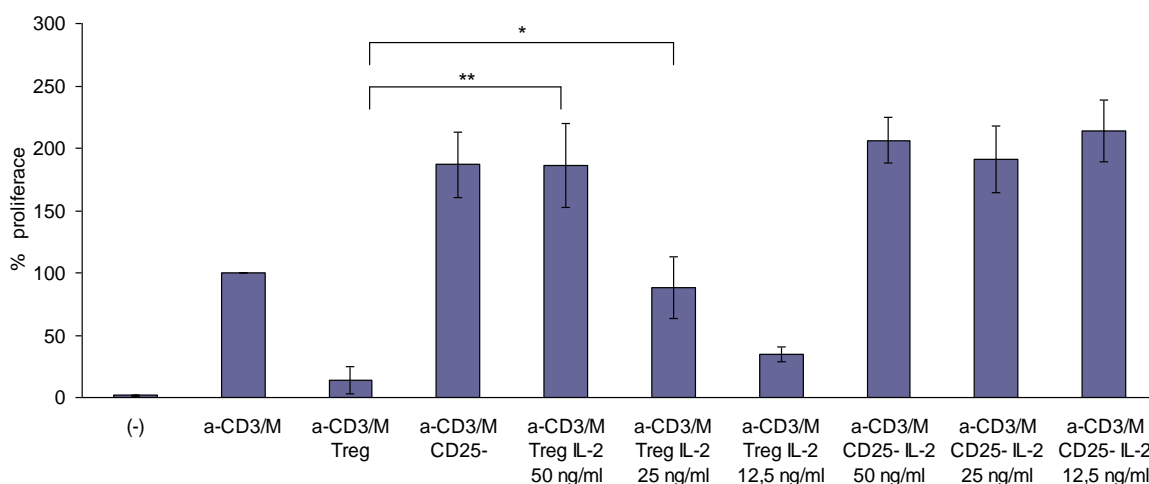
Tyto výsledky také ukazují, že Treg tlumí produkci IL-2 na genové úrovni. Dále je však pravděpodobné, dle výsledků z ELISA testu, že supresorová schopnost Treg je z části způsobená i vychytáváním IL-2 v kultuře, neboť u prvních třech modelů při aktivaci stimulovaných buněk je v kultuře v přítomnosti Treg velmi málo IL-2.

Pro ověření, zda vysoká produkce IL-2 může způsobovat oslabení až vymizení suprese Treg, byly provedeny funkční proliferační testy v přítomnosti exogenního IL-2.

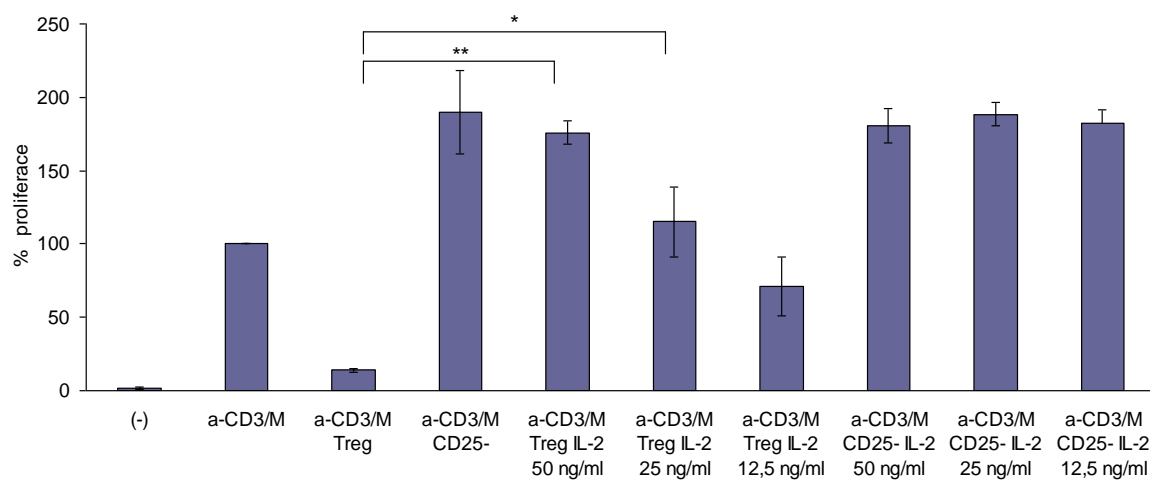
6.10. Suprese proliferace v přítomnosti exogenního IL-2

Rozdíly v supresi proliferace mezi jednotlivými způsoby aktivace mohou být způsobeny kvantitativně a kvalitativně odlišným způsobem aktivace. Jednotlivé způsoby stimulace efektorových lymfocytů se liší množstvím IL-2 v kultuře. Zda může nadbytek IL-2 supresi eliminovat bylo ověřeno přidáváním exogenního IL-2 do pokusu, kde byly efektorové lymfocyty stimulovány mAb anti-CD3 za přítomnosti makrofágů. Treg v tomto modelu proliferace bez exogenního IL-2 významně tlumí. Do jamek s Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty jako kontrolou byl přidán myší nebo lidský IL-2 ve třech koncentracích (50, 25 a 12,5 ng/ml). Přidání exogenního IL-2, myšího i lidského původu, supresorovou schopnost Treg signifikantně potlačilo. Tato inhibice suprese byla závislá na koncentraci přidávaného IL-2 (Obr. 16, 17).

Tento výsledek podporuje předchozí hypotézu, která spojuje efektivitu suprese při různých způsobech stimulace efektorových buněk s jejich rozdílnou mírou aktivace a produkce IL-2.



Obr. 16: Suprese proliferace efektorových buněk v přítomnosti exogenního myšího IL-2. $CD4^+CD25^-$ lymfocyty byly kultivovány samotné (-), aktivované mAb anti-CD3 a makrofágy (a-CD3/M) a aktivované s Treg nebo $CD4^+CD25^-$ lymfocyty v poměru 1:1. Dále byl do jamek s Treg a $CD4^+CD25^-$ přidán myší IL-2 v koncentracích (50, 25 a 12,5 ng/ml). Výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Hodnota označená * představuje hladinu signifikance $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.



Obr. 17: Suprese proliferace v přítomnosti exogenního lidského IL-2. Legenda jako obrázek 16, pouze je přidán lidský IL-2 místo myšího.

7. Diskuze

Ze slezinného homogenátu byla získána populace Treg, která vykazovala supresorové vlastnosti. Pokud byly při proliferaci efektorových buněk v různých modelech aktivace přítomny makrofágy, suprese Treg byla vyšší. To vedlo k testování možného působení Treg na makrofágy. Nejdříve bylo testováno ovlivnění kostimulačních molekul makrofágů.

O působení Treg na expresi kostimulačních molekul specificky na makrofázích je článků velmi málo. Podobné pokusy jako v naší práci byly provedeny s lidskými monocyty/makrofágy odebranými z periferní krve (Taams et al. 2005). Přítomnost kostimulačních molekul na makrofázích byla testována průtokovou cytometrií 40 hodin po aktivaci, na rozdíl od námi použitých 24 hodin. Naše zde neuvedené pokusy ukázaly, že každá molekula má jinou kinetiku exprese a že velmi záleží na době aktivace, proto nelze naše výsledky srovnávat. V obou pracích byl také použit odlišný způsob aktivace. Na rozdíl od naší práce byly monocyty stimulovány pomocí lymfocytů aktivovaných protilátkou anti-CD3. V přítomnosti Treg jsme na rozdíl od Taamse et al. nepozorovali žádný významný rozdíl v expresi kostimulačních molekul proti kontrole. Do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet způsob aktivace Taamse et al. na peritoneálních myších makrofázích.

Ačkoliv cytotoxické působení Treg bylo několikrát dokázáno, mechanismus zůstává stále sporný. Bylo ukázáno, že lidské aktivované Treg zabíjejí T lymfocyty i $CD14^+$ buňky (což jsou mimo jiné i monocyty/makrofágy). Aktivované Treg byly granulární a granula obsahovala granzym A. Mechanismus byl určen jako závislý na perforinu (Grossman et al. 2004a). Stejní autoři testovali Tr1 regulační buňky, vzniklé z $CD4^+$ naivních lymfocytů stimulací anti-CD3/CD46 protilátkami a IL-2, na přítomnost granzymů. Tr1 buňky produkují velké množství IL-10 a jejich supernatant tlumí proliferaci efektorových lymfocytů. Tr1 buňky exprimují granzym B a jejich zabíjení je závislé na perforinu (Grossman et al. 2004b). Tyto indukované regulační buňky tedy používají granzym B, na rozdíl od přirozených Treg používajících granzym A.

Rozdílné výsledky byly získány na myším modelu. Treg zde exprimovaly granzym B a cytotoxické působení bylo nezávislé na perforinu. Tento rozdíl může být způsoben druhovou odlišností nebo rozdílným způsobem aktivace - na lidském modelu byly efektorové lymfocyty stimulovány vázanými anti-CD3 a anti-CD28

protilátkami, na myším modelu rozpustnou anti-CD3 a ozářenými slezinnými buňkami zbavenými T lymfocytů jako APC. Treg zabíjely aktivované T lymfocyty, na jiných buňkách nebylo jejich cytotoxické působení testováno (Gondek et al. 2005).

V dalším pokusu na myším modelu byl znovu potvrzen granzym B jako molekula uplatňující se v cytotoxickém mechanismu působení Treg. Treg zabíjely pouze B lymfocyty, nikoliv aktivované T lymfocyty. Zajímavé je, že Treg zabíjely selektivně více B lymfocyty prezentující antigen (Zhao et al. 2006). Jiné APC testovány nebyly, nicméně tento fakt by mohl naznačovat selektivní zabíjení APC. Cytotoxický mechanismus byl v tomto případě určen jako částečně závislý na perforinu. Tento výsledek (Zhao et al. 2006). je mírně odlišný od výše zmíněného (Gondek et al. 2005), oba se však shodují, že zabíjení musí probíhat alespoň zčásti na perforinu nezávislým mechanismem. V práci Zhao et al. byla pro cytotoxické působení Treg nutná nejen jejich aktivace, ale i přítomnost mAb anti-CD3 v kultuře pro restimulaci aktivovaných Treg. Bez restimulace se jejich cytotoxické účinky neprojeví. Pouze restimulované Treg vykazovaly cytotoxické účinky.

Jiný způsob působení Treg na monocyty/makrofágy byl popsán v souvislosti se septickým šokem. Treg zabránily monocytům/makrofágům v přežití indukovaném LPS. Ztráta CD14 molekuly, součásti LPS receptoru, v přítomnosti Treg vedla k apoptotické smrti monocytů/makrofágů. V naší práci byly makrofágy označeny pomocí molekuly F4/80, ale pro další pokračování by bylo vhodné použít molekulu CD14 a sledovat, jak její exprese ovlivňují Treg a LPS v našem myším modelu. Vzhledem k používané aktivaci pomocí LPS by tento způsob působení Treg mohl hrát roli i v naší práci (Venet et al. 2006).

Ve všech modelech testování cytotoxických účinků Treg se používají aktivované Treg. V našich zde uvedených pokusech jsme pracovali pouze s čerstvě izolovanými Treg a jejich cytotoxické působení jsme nezaznamenali. Potvrdilo se, že čerstvě izolované Treg nejsou schopné cytotoxické aktivity. Ve zde neuvedených pokusech jsme testovali i aktivované Treg. Opět se nám nepodařilo prokázat cytotoxické působení Treg na makrofágy. Problémem byla špatná kondice získaných aktivovaných Treg. Aktivované Treg měli výrazně horší čistotu než čerstvě izolované a měly velký podíl mrtvých a umírajících buněk. Pokud by byly použity tyto Treg, domníváme se, že jejich rozpad v kultuře a uvolňování lytických enzymů z cytoplazmy by mohlo nepřímo způsobit neprospívání a umírání

sledovaných efektorových buněk nebo makrofágů. Umírání čerstvých Treg by mohlo vysvětlit nevýznamné pozorované rozdíly v počtu mrtvých buněk. Dalším problémem by mohla být fagocytická aktivita makrofágů, která by znemožnila analýzu počtu mrtvých buněk na průtokovém cytometru. Cytotoxické mechanismy jsme také neúspěšně testovali metodou uvolňování radioaktivního chromu (zde neuvedeno). Pro další práci navrhuji vylepšit kondici aktivovaných Treg a jejich udržování (např. restimulací mAb anti-CD3 v kultuře s makrofágy) a pokusy opakovat s pouze s aktivovanými Treg.

Jedním z dalších popsaných mechanismů působení Treg na makrofágy je modulace aktivace makrofágů a jejich cytokinové produkce. Zdá se, že Treg směřují makrofágy k "alternativně aktivovaným makrofágům", které působí regulačně a protizánětlivě. Treg modulují cytokinovou produkci makrofágů od prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 směrem k protizánětlivým IL-1Ra a IL-10 a zvyšují jejich fagocytickou aktivitu. Tento mechanismus byl popsán na lidském modelu (Taams et al. 2005). V naší práci jsme změnu produkce makrofágových cytokinů v přítomnosti Treg netestovali. Zjištění cytokinového profilu myších makrofágů po kultivaci s Treg by mohlo být dalším cílem naší práce. Ovlivnění cytokinové produkce makrofágů by mohlo být hledaným mechanismem působení Treg na makrofágy.

V naší práci tedy nebyl ukázán mechanismus přímého působení Treg na makrofágy, a proto byla znovu testována základní hypotéza o lepších supresorových schopnostech Treg v přítomnosti makrofágů. Byl zaveden nový model, kde byly efektorové lymfocyty stimulovány rozpustnými mAb anti-CD3 a anti-CD28. Treg v tomto modelu vůbec netlumily proliferaci efektorových lymfocytů. To vedlo ke změně původní hypotézy, kdy bylo dále testováno množství důležitého aktivačního cytokinu IL-2 produkovaného efektorovými lymfocyty jako ukazatele síly aktivace efektorových lymfocytů.

U jednotlivých způsobů aktivace bylo stanoveno množství IL-2 v supernatantu. V modelu, kde Treg netlumily proliferaci efektorových lymfocytů, bylo množství IL-2 v kultuře s Treg stejné jako u jiných způsobů aktivace u stimulovaných efektorových lymfocytů. U ostatních způsobů aktivace bylo množství IL-2 s Treg velmi malé, a rozdíly nebyly kvůli malým hodnotám signifikantní. Určitý nesignifikantní trend korelující s výsledky proliferačních pokusů však lze vysledovat. Množství IL-2 v kultuře tedy negativně koreluje s mírou Treg suprese. Pokud bylo v kultuře velké množství IL-2, Treg netlumily proliferaci

efektorových lymfocytů. Vliv působení IL-2 na supresi Treg byl ověřen přidáváním exogenního IL-2 do kultury, kde Treg tlumily proliferaci efektorových lymfocytů. Přidání IL-2 supresi eliminovalo, se snižujícím se množstvím exogenního IL-2 se suprese obnovovala. Pokud je produkce IL-2 silná a je ho v kultuře velké množství, Treg nedokáží efektivně tlumit proliferaci efektorových lymfocytů. Původně pozorované rozdíly v supresi v různých modelech jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnou kvalitou a kvantitou stimulace, ne přítomností nebo nepřítomností makrofágů.

Naše pozorování je v souladu s dříve publikovanými výsledky, že Treg méně tlumí proliferaci efektorových lymfocytů způsobenou vázanými protilátkami a netlumí, pokud je v kultuře přítomna rozpustná mAb anti-CD28 (Thornton a Shevach 1998). Protilátka anti-CD28 spouští totiž v efektorových lymfocytech přepis genu pro IL-2 a Treg nejsou schopné tuto indukci tlumit. Jednotlivé způsoby aktivace poskytují různě silné aktivační signály a dojde k produkci rozdílného množství IL-2 v kultuře. Je známo, že Treg působí na proliferaci efektorových buněk buď vyvazováním IL-2 nebo potlačením jeho produkce na genové úrovni (Thornton a Shevach 1998, Pandiyan et al. 2007).

Tlumení produkce IL-2 na úrovni genové exprese je popsáno již dlouho, ale není jisté, zda se jedná o jediný mechanismus (Thornton a Shevach 1998, Thornton et al. 2004). Zdá se, že Treg tlumí produkci IL-2 hlavně na genové úrovni, ale stále vzniká menší množství IL-2, který je Treg vyvazován (Busse et al. 2010). Nedostatek IL-2 snižuje expresi CD25 molekul na aktivovaných lymfocytech a vede k jejich utlumení, naopak Treg přítomné v této kultuře zvýší expresi CD25 molekul (de la Rosa et al. 2004, Barthlott et al. 2005). V roce 2007 vyšel ojedinělý článek, kde nebylo s Treg zaznamenáno snížení množství mRNA pro IL-2 a kde bylo množství intracelulárního IL-2 stejné u lymfocytů inkubovaných v přítomnosti Treg i bez nich. Snížení IL-2 v supernatantu bylo způsobeno pouze vyvazováním IL-2 (Pandiyan et al. 2007). Tento názor je pouze ojedinělý a většina experimentů ukazuje na kombinaci obou forem suprese - základní tlumení na genové úrovni a vyvázání zbylého malého množství IL-2. Naše výsledky by také mohly ukazovat na kombinaci obou mechanismů, je však třeba další testování. Množství mRNA pro IL-2 v efektorových lymfocytech s Treg se snižuje, a to do podobné míry jako bylo u daných způsobů aktivace pozorováno v proliferačních testech. Množství IL-2 mRNA negativně koreluje s mírou suprese Treg u různých způsobů aktivace. I přes detekci mRNA pro IL-2 v přítomnosti Treg je množství

naměřeného IL-2 v supernatantu velmi malé, což by mohlo ukazovat na to, že Treg malé množství vzniklého IL-2 vyváží. Kapacita tlumit transkripci mRNA pro IL-2 a vyvážovat ho je však omezená, jak je ukázáno na modelu, kde jsou efektorové lymfocyty aktivovány velmi silně rozpustnými mAb anti-CD3/CD28 a makrofágy a Treg netlumí. Množství IL-2 je zde zvýšené na obou úrovních.

Jak je zmíněno výše, přidání exogenního IL-2 supresi eliminovalo, a to v závislosti na koncentraci. Treg pravděpodobně nedokázaly tak velké množství IL-2 vyvážet. Do budoucna bych v tomto modelu ověřila, zda Treg stále tlumí produkci IL-2 na genové úrovni v efektorových lymfocytech i při přidání exogenního IL-2, jak již bylo popsáno (Thornton et al. 2004).

Pozorované snížení suprese v přítomnosti IL-2 může být zčásti způsobené i samotnou proliferací Treg, které jsou stimulované přítomností velkého množství IL-2 a mAb anti-CD3.

Podle dostupných literárních zdrojů Treg působí různými způsoby na APC, nám se toto působení nepodařilo dokázat. Do budoucna by bylo vhodné pokusy zopakovat s pozměněným postupem. Velmi nadějně by mohlo být i testování ovlivnění makrofágové produkce cytokinů. Vhodné by bylo i použití DC jako nejdůležitějších APC. Námi pozorované rozdíly v supresi při různých způsobech aktivace jsou tedy pravděpodobně způsobeny kvantitativně nebo kvalitativně odlišným způsobem aktivace efektorových lymfocytů a mechanismus Treg suprese se zdá být způsoben tlumením produkce IL-2 na genové úrovni a vyvážováním zbylého vzniklého IL-2. Pro ověření této hypotézy je však potřeba dalšího testování.

8. Závěr

Byla připravena vysoce purifikovaná frakce $CD4^+CD25^+$ lymfocytů, která vykazovala supresorové vlastnosti. Efektorové lymfocyty byly stimulovány různými způsoby a bylo pozorováno, že v přítomnosti makrofágů je Treg suprese vyšší. Treg však v našich pokusech neovlivňovaly kostimulační vlastnosti makrofágů, nesnižovaly množství kostimulačních molekul CD80, CD86 nebo CD40 a MHCII molekul ani nezpůsobovaly apoptózu makrofágů. Do budoucna by bylo dobré pokusy zopakovat a použít aktivované Treg. Při aktivaci efektorových buněk rozpustnými mAb anti-CD3, anti-CD28 a makrofágy Treg proliferaci netlumily. To vedlo k hypotéze, že pozorované rozdíly v supresi při různých způsobech aktivace jsou způsobeny rozdílnou kvalitou a kvantitou aktivačního signálu. U jednotlivých způsobů aktivace proto bylo zjišťováno množství IL-2 v kultuře. U způsobu aktivace, kde Treg netlumily proliferaci efektorových lymfocytů, bylo v kultuře s Treg zjištěno stejné množství IL-2 jako u jiných způsobů aktivace u stimulovaných buněk bez Treg. V ostatních způsobech, kde Treg tlumily, bylo v jejich přítomnosti v kultuře pouze malé množství IL-2. Proto bylo stanovováno, zda Treg vyvazuje IL-2 svým receptorem nebo zda tlumí jeho produkci efektorovými lymfocyty na genové úrovni. Bylo prokázáno, že Treg tlumí produkci IL-2 efektorovými lymfocyty na genové úrovni. Inhibice exprese mRNA pro IL-2 korelovala s mírou suprese v proliferačních testech. Pozorované rozdíly v supresi byly pravděpodobně způsobeny rozdílnou kvantitou nebo kvalitou aktivace efektorových lymfocytů. Přidáváním exogenního IL-2 bylo dokázáno, že IL-2 snižuje supresi v závislosti na koncentraci a že míra suprese závisí na množství IL-2 v kultuře a tím na míře aktivace efektorových buněk.

9. Seznam Literaturny

Austyn, J. M. & S. Gordon (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11, 805-15.

Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Herminé & O. Devergne (2008) Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol*, 181, 6898-905.

Barthlott, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. Atkins, J. Christensen, A. O'Garra & B. Stockinger (2005) CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol*, 17, 279-88.

Bodor, J., L. Feigenbaum, J. Bodorova, C. Bare, M. S. Reitz & R. E. Gress (2001) Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J Leukoc Biol*, 69, 1053-9.

Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit & E. Schmitt (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204, 1303-10.

Brunkow, M., E. Jeffery, K. Hjerrild, B. Paepers, L. Clark, S. Yasayko, J. Wilkinson, D. Galas, S. Ziegler & F. Ramsdell (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27, 68-73.

Buechler, C., M. Ritter, E. Ors , T. Langmann, J. Klucken & G. Schmitz (2000) Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*, 67, 97-103.

Busse, D., M. de la Rosa, K. Hobiger, K. Thurley, M. Flossdorf, A. Scheffold & T. Höfer (2010) Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3058-63.

Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms & T. J. Ley (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27, 635-46.

Cederbom, L., H. Hall & F. Ivars (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 30, 1538-43.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg & D. A. Vignali (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-9.

de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dörninger & A. Scheffold (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34, 2480-8.

Fontenot, J., M. Gavin & A. Rudensky (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 330-6.

Fraser, J., B. Irving, G. Crabtree & A. Weiss (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*, 251, 313-6.

Gershon, R. & K. Kondo (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18, 723-37.

Gondek, D., L. Lu, S. Quezada, S. Sakaguchi & R. Noelle (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174, 1783-6.

Gordon, S., L. Lawson, S. Rabinowitz, P. R. Crocker, L. Morris & V. H. Perry (1992) Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol*, 181, 1-37.

Grossman, W., J. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. Atkinson & T. Ley (2004a) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21, 589-601.

Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson & T. J. Ley (2004b) Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104, 2840-8.

Heidenreich, S., M. Schmidt, C. August, P. Cullen, A. Rademaekers & H. Pauels (1997) Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J Immunol*, 159, 3178-88.

Kim, H., J. Kelly & W. Leonard (2001) The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements. *Immunity*, 15, 159-72.

Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen & W. Zou (2006) Cutting edge: induction of B7-H4 on APC through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*, 177, 40-4.

Linsley, P., J. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. Ledbetter, C. Anasetti & N. Damle (1992) Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*, 176, 1595-604.

Malek, T., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli & L. Kong (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 17, 167-78.

Nakamura, K., A. Kitani & W. Strober (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194, 629-44.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi & S. Sakaguchi (2008) Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10113-8.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed & M. Lenardo (2007) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 8, 1353-62.

Paust, S., L. Lu, N. McCarty & H. Cantor (2004) Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10398-403.

Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara & E. M. Shevach (2002) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*, 196, 237-46.

Read, S., V. Malmström & F. Powrie (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192, 295-302.

Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi & T. Masuda (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*, 161, 72-87.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh & M. Toda (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155, 1151-64.

Schorle, H., T. Holtschke, T. Hünig, A. Schimpl & I. Horak (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 352, 621-4.

Schubert, L., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell & S. Ziegler (2001) Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem*, 276, 37672-9.

Shevach, E. & G. Stephens (2006) The GITR-GITRL interaction: costimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*, 6, 613-8.

Stein, M., S. Keshav, N. Harris & S. Gordon (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 176, 287-92.

Taams, L., J. van Amelsfort, M. Tiemessen, K. Jacobs, E. de Jong, A. Akbar, J. Bijlsma & F. Lafeber (2005) Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol*, 66, 222-30.

Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu & S. Sakaguchi (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10, 1969-80.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak & S. Sakaguchi (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, 192, 303-10.

Taylor, P. A., C. J. Lees, S. Fournier, J. P. Allison, A. H. Sharpe & B. R. Blazar (2004) B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J Immunol*, 172, 34-9.

Thornton, A., E. Donovan, C. Piccirillo & E. Shevach (2004) Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*, 172, 6519-23.

Thornton, A. & E. Shevach (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188, 287-96.

Tiemessen, M., A. Jagger, H. Evans, M. van Herwijnen, S. John & L. Taams (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19446-51.

Venet, F., A. Pachot, A. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, W. Powell & G. Monneret (2006) Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*, 177, 6540-7.

Wang, G., M. Khattar, Z. Guo, Y. Miyahara, S. P. Linkes, Z. Sun, X. He, S. M. Stepkowski & W. Chen (2010) IL-2-deprivation and TGF-beta are two non-redundant suppressor mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cell which jointly restrain CD4+CD25- cell activation. *Immunol Lett*, 132, 61-8.

Zhao, D., A. Thornton, R. DiPaolo & E. Shevach (2006) Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 107, 3925-32.